

NOMENCLATURE

A	Absorbance	[-]
as	Surface spécifique éclairée	[$m^2 \cdot m^{-3}$]
D	Taux de dilution	[h^{-1}]
e	Épaisseur de la culture du Photobioréacteur	[m]
f	Facteur de dilution	[-]
G	Irradiance	[$\mu molhv \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$]
GC	Irradiance de compensation	[$\mu molhv \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$]
Gs	Irradiance de saturation	[$\mu molhv \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$]
h	Constante de Planck	[$\mu molhv \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$]
l-1	Profondeur optique de la cuve	[cm]
n	Nombre total des cellules comptées dans l'ensemble des 25 rectangles d'un hématimètre de type Malassez	[Cellules]
N	Concentration cellulaire	[Cellules.ml ⁻¹]
q0	Flux lumineux incident	[$\mu molhv \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$]
Qe	Débit d'alimentation du milieu neuf (débit d'entrée)	[ml/min ou L/h]
Qs	Débit de soutirage de la biomasse	[ml/min ou L/h]
S	Surface illuminée du Photobioréacteur	[m ²]
VR	Volume réactionnel du Photobioréacteur	[m ³]
t	Temps de culture	[jours]
Tf	Temps de la récolte (fin de l'expérience)	[jours]
Ti	Temps du début de l'expérience	[jours]

Lettres Grecques :

γ	Fraction volumique éclairée	[-]
μ	Taux de croissance	[h^{-1}]
τ	Temps de résidence de culture	[h]
λ	Longueur d'onde	[nm]
ν	Fréquence de rayonnement	[Hz]
θ	Angle	[°]

Abréviations :

AAC	Acétyl-CoA carboxylase
AAD1	Acidoacyldesaturase delta 9
ACP	Acyl carrier protein
ADP	Adénosine Di-Phosphate
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
BHT	Butyl-hydroxytoluène
C	Carbone
Chl a	Chlorophylle a
Chl b	Chlorophylle b
CH ₄ N ₂ O	Cyanate d'ammonium
CHCl ₃	Chloroforme
CO ₂	Dioxyde de carbone
CU	Cuivre

E	Microeinstein
FA	Fattyacids
FAD	Flavine adénine dinucléotide, forme oxydée
FADH2	Flavine adénine dinucléotide, forme réduite
FAME	Fattyacidsmethyl ester
GC	Chromatographie gazeuse
GeO ₂	Dioxyde de germanium
GPAT	Glycérol phosphate acyl transférase
KOH	Hydroxyde de potassium
LED	Diode Electro-Luminescente
LHCII	Light HarvestingComplex II
Ln	Logarithme népérien
LPAAT	Lysophosphatidicacidacyltransferase
LT	Lipides Totaux
MEB	Microscope électronique à balayage
MeOH	Méthanol
MS	Matière Sèche
MVREA	Mean volumetric rate of energy absorption
NADP ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme oxydée
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite
N	Azote
NaCL	Chlorure de sodium
NaHCO ₃	Bicarbonate de sodium
Na ₂ HPO ₄	Sodium phosphate dibasic
NaNO ₃	Nitrate de sodium
NH ₄ CL	Chlorure d'ammonium
NH ₄ OH	Ammonium hydroxide
P	Phosphore
P680	Centre réactionnel du PSII
P700	Centre réactionnel du PSI
PAR	Photosynthetically Active Radiations
PBR	Photobioréacteur
PC	Plastocyanine
PCR	Polymerase chain reaction,
PFD	Photons Flux Density
pH	Potentiel hydrogène
Pheo	Phéophytine
PMMA	PolyMethylMethAcrylate
PPC	Photo-Protective carotenoids
PQ	Plastoquinone
PSI	Photosystème I
PSII	Photosystème II
PSU	Practical salinity unit
Q	Ubiquinone, forme oxydée
QA	Quinone A
QB	Quinone B
QH2	Ubiquinone, forme réduite
QR	Quantum Requirement For Oxygen Production
rpm	Rotation par minute
RuBisCO	Ribulose 1,5-biphosphate carboxylase/oxygénase

SAB	Sérum albumine bovine
SPE	Solid-Phase Extraction
TAE	Tris, Acétate, EDTA
TAG	Triacylglycérol

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	i
Résumé	iv
NOMENCLATURE	viii
TABLE DES MATIERES	xi
LISTE DES FIGURES	xv
LISTE DES TABLEAUX	xx
Introduction	1
Chapitre I - Etat de l'art et objectifs de l'étude	4
I.1. Généralités sur les microalgues.....	4
I.1.1. Caractéristiques.....	4
I.1.2. Distribution et Habitats.....	5
I.1.3. Composition et Modes de nutrition.....	6
I.1.3.1. Mode autotrophe.....	6
I.1.3.2. Mode hétérotrophe.....	6
I.1.3.3. Modemixotrophe.....	7
I.1.4. Eléments majeurs constitutifs des microalgues.....	7
I.1.5. Diversité et classification des microalgues.....	8
I.1.5.1. Les procaryotes.....	8
I.1.5.2. Les eucaryotes.....	8
I.1.6. La photosynthèse.....	10
I.1.6.1. Phase photochimique.....	11
I.1.6.1.1. La lumière, source d'énergie des microalgues.....	12
I.1.6.1.2. Fonctionnement d'un photosystème et de la captation de l'énergie lumineuse.....	12
I.1.6.1.3. Principe de la chaîne photosynthétique.....	13
I.1.6.2. Phase d'assimilation de CO_2 ou phase obscure (non dépendante de la lumière) ..	15
I.1.7. La respiration cellulaire.....	16
I.1.7.1. Photorespiration.....	16
I.1.8. Molécules d'intérêts produites par les microalgues.....	16
I.1.8.1. Les lipides.....	16
I.1.8.2. Les protéines.....	19
I.1.8.3. Les pigments et les antioxydants.....	20
I.1.8.4. Les glucides.....	21
I.2. Culture des microalgues.....	22
I.2.1. L'impact des paramètres de culture sur la croissance des microalgues.....	22
I.2.1.1. Le carbone.....	22
I.2.1.2. Le substrat azoté.....	22
I.2.1.3. Le phosphore.....	22
I.2.1.4. Les microéléments.....	23
I.2.1.5. La lumière.....	23
I.2.1.6. La température.....	26
I.2.1.7. Le pH.....	27
I.2.1.8. Salinité du milieu.....	27
I.2.2. Caractéristiques intrinsèques du photobioréacteur.....	28
I.2.2.1. Agitation.....	28
I.2.2.2. Eclairage.....	28
I.2.3. Système de cultures des microalgues.....	29
I.2.3.1. Systèmes ouverts.....	29
I.2.3.2. Systèmes fermés.....	30
I.2.4. Modes de culture.....	34
I.2.4.1. Culture en mode discontinu.....	34
I.2.4.2. Culture en mode continu.....	34
I.3. Applications des microalgues.....	36
I.3.1. Domaine alimentaire.....	36

I.3.2.	Domaine pharmaceutique.....	37
I.3.3.	Domaine cosmétique	38
I.3.4.	Domaine énergétique.....	38
I.3.4.1.	Production de bio méthane	38
I.3.4.2.	Production de biocarburant	38
I.3.4.3.	Production de bio-oil.....	39
I.3.4.4.	Production de biodiesel	39
I.3.4.5.	Production de bio-hydrogène	39
I.3.5.	Domaine environnemental	40
I.3.5.1.	Traitement des eaux usées.....	40
I.3.5.2.	Agriculture	40
I.3.5.3.	Séquestration du CO_2	41
I.4.	Présentation du modèle d'étude.....	42
I.4.1.	<i>Nannochloropsis gaditana</i>	42
I.4.2.	<i>Tetranephris brasiliensis</i>	43
I.4.3.	<i>Scenedesmus sp.</i>	44
Chapitre II - Matériel et méthodes		49
II.1.	Isolement et purification des souches.....	49
II.1.1.	Cadre de l'échantillonnage.....	49
II.1.1.1.	Spécificités de la région d'échantillonnage : l'estuaire de l'Oued Chélif.....	49
II.1.1.2.	Mesures physico-chimiques	49
II.1.2.	Description morphologique des taxons observés au niveau de l'estuaire de l'Oued Chélif	50
II.1.3.	Purification des souches isolée à partir de l'estuaire de l'Oued Chélif.....	50
II.1.4.	Provenance de la microalgue marine.....	50
II.1.5.	Transfert et maintenance des cultures	51
II.1.6.	Identification des souches étudiées	51
II.1.6.1.	Identification des souches étudiées par observation au microscope électronique à balayage (MEB).....	51
II.1.6.2.	Identification des souches étudiées par des techniques de Biologie Moléculaire	52
II.2.	Mise en culture	53
II.2.1.	Dispositif expérimental : miniphotobioréacteur de 1000 ml.....	53
II.2.2.	Maintenance des cultures mères.....	54
II.2.3.	Choix du milieu de culture	54
II.2.4.	Caractérisation qualitative et quantitative de la croissance en conditions optimales des souches cultivées en mini photobioréacteur.....	55
II.2.5.	Comportement et adaptation des souches	55
II.3.	Validation des performances en croissance des souches dans des conditions de culture optimales et défavorables.....	56
II.3.1.	Paramètres physiques	56
II.3.1.1.	Intensité lumineuse et photopériodes	56
II.3.1.2.	Température	56
II.3.1.3.	Potentiel hydrogène (pH)	56
II.3.1.4.	Salinité.....	56
II.3.1.5.	Surface spécifique éclairée.....	56
II.3.1.6.	Elaboration d'un système de culture de type plat à l'échelle pilote	56
II.3.2.	Paramètres biochimique (Optimisation du milieu F/2Guillard).....	58
II.3.2.1.	Concentration en bicarbonate de sodium	58
II.3.2.2.	Source et concentration initiale d'azote	58
II.3.2.3.	Concentration en phosphate	59
II.4.	Potentialités des effluents de piscicultures intensives à produire des microalgues en masse.....	60
II.4.1.	Matériel biologique	60
II.4.2.	Infrastructure d'élevage.....	60

II.4.3.	Paramètres physico-chimiques	60
II.4.4.	Ration alimentaire et fréquence de nourrissage.....	61
II.5.	Protocoles d'analyse et détermination des grandeurs des souches.....	61
II.5.1.	Récolte de la biomasse et lyophilisation	61
II.5.2.	Dénombrement cellulaire	62
II.5.3.	Estimation du taux de croissance et du temps de génération	62
II.5.4.	Dosage des protéines (Méthode de Bradford).....	62
II.5.5.	Dosage des carbohydrates	62
II.5.6.	Détermination de la concentration et de la composition des pigments	63
II.5.7.	Extraction des lipides totaux	64
II.7.	Analyse statistique.....	64
Chapitre III - Résultats		65
III.1.	Description morphologique des taxons observés au niveau de l'estuaire de l'Oued Chélif	65
III.1.1.	Caractères principaux des genres de microalgues observées	65
III.1.2.	Identification morphologique des souches étudiées par observation au microscope électronique à balayage (MEB).....	68
III.1.3.	Identification des souches étudiées par techniques de biologie moléculaire.....	69
III.1.4.	Évaluation de la facilité de culture des souches (Caractérisation qualitative et quantitative de la croissance en conditions optimales des souches cultivées en miniphotobioréacteur).....	70
III.2.	Validation des performances en croissance des souches dans des conditions de culture optimales et défavorables.....	72
III.2.1.	Paramètres physiques	72
III.2.1.1.	<i>Nannochloropsis gaditana</i>	72
III.2.1.1.1.	Influence des flux incidents et des différentes photopériodes sur la croissance cellulaire et la composition biochimique	72
III.2.1.1.2.	Influence de la température sur la croissance cellulaire et la composition biochimique	74
III.2.1.1.3.	Influence du pH sur la croissance cellulaire et la composition biochimique.....	75
III.2.1.1.4.	Influence de la salinité sur la croissance cellulaire et la composition biochimique	77
III.2.1.1.5.	Étude de différentes géométries de photobioréacteur.....	78
III.2.1.2.	<i>Tetranephris brasiliensis</i>	81
III.2.1.2.1.	Influence des flux incidents et différentes photopériodes sur la croissance cellulaire et la composition biochimique.....	81
III.2.1.2.2.	Influence de la température sur la croissance cellulaire et la composition biochimique.....	83
III.2.1.2.3.	Influence du pH sur la croissance cellulaire et la composition biochimique.....	84
III.2.1.2.4.	Étude de différentes géométries de photobioréacteur.....	85
III.2.1.3.	<i>Scenedesmus sp.</i>	88
III.2.1.3.1.	Influence des flux incident et de différentes photopériodes sur la croissance cellulaire et la composition biochimique.....	88
III.2.1.3.2.	Influence de la température sur la croissance cellulaire et la composition biochimique.....	90
III.2.1.3.3.	Influence du pH sur la croissance cellulaire et la composition biochimique.....	91
III.2.1.3.4.	Étude de différentes géométries de photobioréacteur.....	92
III.2.2.	Paramètres biochimiques.....	95
III.2.2.1.	<i>Nannochloropsis gaditana</i>	95
III.2.2.1.1.	Influence de différentes concentration en bicarbonate de sodium sur la croissance cellulaire et la composition biochimique	95
III.2.2.1.2.	Influence de différentes sources et concentration d'azote sur la croissance cellulaire et la composition biochimique.....	96

III.2.2.1.3. Influence de la concentration en phosphate sur la croissance cellulaire et la composition biochimique	99
III.2.2.2. <i>Tétranephris brasiliensis</i>	101
III.2.2.2.1. Influence de différentes concentration en bicarbonate de sodium sur la croissance cellulaire et la composition biochimique	101
III.2.2.2.2. Influence de différentes sources et concentration d'azote sur la croissance cellulaire et la composition biochimique	102
III.2.2.2.3. Influence de la concentration en phosphate sur la croissance cellulaire et la composition biochimique	105
III.2.2.3. <i>Scenedesmus sp.</i>	107
III.2.2.3.1. Influence de différentes concentration en bicarbonate de sodium sur la croissance cellulaire et la composition biochimique	107
III.2.2.3.2. Influence de différentes sources et concentration d'azote sur la croissance cellulaire et la composition biochimique.....	108
III.2.2.3.3. Influence de la concentration en phosphate sur la croissance cellulaire et la composition biochimique	111
III.3. Etude de la potentialité des effluents de piscicultures intensives à produire des microalgue en masse	112
III.3.1. <i>Nannochloropsis gaditana</i>	113
III.3.2. <i>Tetranephris brasiliensis</i>	115
III.3.3. <i>Scenedesmus sp.</i>	118
Chapitre IV - Discussion et conclusions	122
IV.1. Discussion	122
IV.2. Conclusions et perspectives.....	140149
Chapitre V - Bibliographie	141153
ANNEXE 1 : Extraction de l'ADN génomique	159
ANNEXE 2 : Composition du milieu f/2 Guillard (Guillard and Ryther 1963).....	160
ANNEXE 3 : Dénombrement cellulaire	160179
ANNEXE 4 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des carbohydrate par la méthode de Dubois...163	
ANNEXE 5 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode de Bradford.....164	
ANNEXE 6 : Les paramètres indicateurs de la qualité de l'eau piscicole.....165	

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Ultrastructure de microalgues (Pignolet et <i>al.</i> , 2013) Cellules de microalgues : verte (a), rouge (b) et cyanobactérie (c).....	5
Figure 2 : photo du globe vu par image satellite montrant les zones riches en phytoplancton (en vert) (http://www.safer.fr/safer-la-reunion.asp).....	6
Figure 3 : La photosynthèse (réaction globale).....	11
Figure 4 : Structure d'un chloroplaste	11
Figure 5 : Spectre d'absorption des pigments photosynthétiques.....	12
Figure 6 : La chaîne photosynthétique.....	13
Figure 7 : Schéma Z de la photosynthèse.....	14
Figure 8 : Cycle de Calvin	15
Figure 9 : La chaîne respiratoire	16
Figure 10 : Structure des principaux caroténoïdes de microalgues (Guaratini et <i>al.</i> , 2009).....	20
Figure 11 : Rendement photosynthétique en fonction de l'intensité lumineuse incidente (exprimée en $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) (Goldman, 1980).....	22
Figure 12 : Bassins : a) Culture de <i>Dunaliella salina</i> en bassins naturels de 200 ha, Cognis nutrition (Australie) b) Culture de Spiruline en raceway, Californie (Andersen, 2005).....	30
Figure 13 : Photobioréacteur plan (Bitog et <i>al.</i> , 2011).....	31
Figure 14 : Colonne à bulles (FAO, 1996).....	32
Figure 15 : Photobioréacteurs tubulaires (horizontaux).....	33
Figure 16 : Système « Plastic bag » (Pulz, 2007).....	34
Figure 17 : Présentation schématique des modes de fonctionnement en continu d'un PBR. A : mode de fonctionnement en chemostat, dans ce cas le débit d'entrée est maintenu constant. B : mode de fonctionnement en <i>turbidostat</i> , la biomasse est maintenue constante en utilisant une sonde de mesure de biomasse et un système de régulation qui pilote la pompe d'alimentation du milieu neuf (consigne biomasse fixée par l'utilisateur).....	36
Figure 18 : Photo de la micro algue <i>Nannochloropsis sp</i> (Tanzi, 2013).....	43
Figure 19 : <i>Tetranephris brasiliensis</i> vu sous microscope optique (D'après Hoshina, 2014)	44
Figure 20 : Photo d'une cénobie formée de huit cellules de la microalgue <i>Scenedesmus obliquus</i> (Qin et <i>al.</i> , 2008)	45
Figure 21 : Localisation des sites d'échantillonnage (S1) et (S2) au niveau de l'estuaire de l'Oued Cheliff	49
Figure 22 : Photo représentative du microscope électronique à balayage (MEB)	52
Figure 23 : Schéma du mini photobioréacteur à bullage d'air (<i>AQUABIOR</i> , 2017).....	53
Figure 24 : Système de culture utilisé au cours de l'étude expérimentale (<i>AQUABIOR</i> , 2017) ..	54
Figure 25 : Photos représentative du système de culture de type plat (<i>AQUABIOR</i> , 2017)	58
Figure 26 : Observation microscopique (microscope optique $\times 100$) °des souches rencontrées au niveau de l'estuaire de l'Oued Chélif (stations S1 de 1 à 9, stations S2 : 9 et 11) (<i>AQUABIOR</i> , 2017)	6566
Figure 27 : Photos des souches étudiées prises après observation au microscope électronique à balayage (<i>Nannochloropsis gaditana</i> (A ($\times 4000$) - B ($\times 9000$)), <i>Tetranephris brasiliensis</i> (C ($\times 4500$) - D ($\times 20000$)), <i>Scenedesmus sp.</i> (E ($\times 8500$) - F ($\times 15000$))	68
Figure 28 : Migration du fragment d'ADN codant pour l'ARNr 18S des deux souches étudiées avec une échelle de poids moléculaire (<i>Trans 5K DNA marker</i>).....	69
Figure 29 : Arbre phylogénétique déduit de la comparaison des séquences des gènes codants pour les ARNr 18S des microalgues par la méthode Neighbor-Joining en utilisant le programme MEGA 6.....	70
Figure 30 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire des trois souches de microalgues étudiées cultivées en condition de croissance normale (favorable) (n=3).....	71
Figure 31 : Histogrammes représentatifs du biovolume cellulaire (a) ainsi que de la surface (b) des souches étudiées (n=50), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$).....	71
Figure 32 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de <i>N gaditana</i> cultivée sous différents flux incidents et différentes photopériodes (n=3)	72

Figure 33 : Variation de la composition biochimique de la souche <i>N gaditana</i> cultivée sous différents flux incidents et différentes photopériodes (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$).....	74
Figure 34 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de <i>N gaditana</i> cultivée sous différentes températures (n=3).....	74
Figure 35 : Variation de la composition biochimique de la souche <i>N gaditana</i> cultivée sous différentes températures (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$).....	75
Figure 36 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de <i>N gaditana</i> cultivée sous différents pH (n=3).....	76
Figure 37 : Variation de la composition biochimique de la souche <i>N gaditana</i> cultivée sous différents pH (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$).....	76
Figure 38 : Evolution temporelle de l'effet de la salinité sur la concentration cellulaire de <i>Nannochloropsis gaditana</i> cultivée sous différentes salinités (n=3).....	77
Figure 39 : Variation de la composition biochimique de la souche <i>N gaditana</i> cultivée sous différentes salinités (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$).....	78
Figure 40 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de <i>N gaditana</i> selon la surface spécifique éclairée (n=3).....	78
Figure 41 : Variation de la composition biochimique de la souche <i>N gaditana</i> cultivée sous différentes surfaces spécifiques éclairées (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$).....	79
Figure 42 : Comparaison d'une évolution temporelle de la concentration cellulaire de <i>N gaditana</i> cultivées dans deux systèmes de culture distincts (A : miniphotobioreacteur cylindrique) et (B : systeme de culture de type plat) (n=3).....	80
Figure 43 : Variation de la composition biochimique de la souche <i>N gaditana</i> cultivée dans deux systèmes de culture distincts (A : miniphotobioreacteur cylindrique), (B : systeme de culture de type plat) (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$).....	80
Figure 44 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de <i>Tétranephris brasiliensis</i> cultivées sous différents flux incidents et différentes photopériodes (n=3).....	81
Figure 45 : Variation de la composition biochimique de la souche <i>Tétranephris brasiliensis</i> cultivée sous différents flux incidents et différentes photopériodes (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$).....	82
Figure 46 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de <i>Tétranephris brasiliensis</i> cultivée sous différentes températures (n=3).....	83
Figure 47 : Variation de la composition biochimique de la souche <i>Tétranephris brasiliensis</i> cultivée sous différentes températures (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$).....	84
Figure 48 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de <i>Tétranephris brasiliensis</i> cultivée sous différents pH (n=3).....	84
Figure 49 : Variation de la composition biochimique de la souche <i>Tétranephris brasiliensis</i> cultivée sous différents pH (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$).....	85
Figure 50 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de <i>Tétranephris brasiliensis</i> selon la surface spécifique éclairée (n=3).....	85
Figure 51 : Variation de la composition biochimique de la souche <i>Tétranephris brasiliensis</i> cultivée sous différentes surfaces spécifiques éclairées (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$).....	86
Figure 52 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de <i>Tétranephris brasiliensis</i> cultivée dans deux systèmes de culture distincts (A : miniphotobioreacteur cylindrique), (B : systeme de culture de type plat) (n=3).....	87
Figure 53 : Variation de la composition biochimique de la souche <i>Tétranephris brasiliensis</i> cultivée dans deux systèmes de culture distincts (A : miniphotobioreacteur cylindrique), (B : photobioreacteur	

plat) (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	87
Figure 54 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de <i>Scenedesmus sp.</i> cultivée sous différents flux incidents et différentes photopériodes (n=3)	88
Figure 55 : Variation de la composition biochimique de la souche <i>Scenedesmus sp.</i> cultivée sous différents flux incidents et différentes photopériodes (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	89
Figure 56 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de <i>Scenedesmus sp.</i> cultivée sous différentes températures (n=3)	90
Figure 57 : Variation de la composition biochimique de la souche <i>Scenedesmus sp.</i> cultivée sous différentes températures (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	91
Figure 58 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de <i>Scenedesmus sp.</i> cultivée sous différents pH (n=3).....	91
Figure 59 : Variation de la composition biochimique de la souche <i>Scenedesmus sp.</i> cultivée sous différents pH (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$).....	92
Figure 60 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de <i>Scenedesmus sp.</i> selon la surface spécifique éclairée (n=3)	92
Figure 61 : Variation de la composition biochimique de la souche <i>Scenedesmus sp.</i> cultivée sous différentes surfaces spécifiques éclairées, les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	93
Figure 62 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de <i>Scenedesmus sp.</i> cultivée dans deux systèmes de culture distincts (A: miniphotobioreacteur cylindrique), (B: système de culture de type plat) (n=3).....	94
Figure 63 : Variation de la composition biochimique de la souche <i>Scenedesmus sp.</i> cultivée dans deux systèmes de culture distincts (A : miniphotobioreacteur cylindrique), (B : système de culture de type plat) (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	94
Figure 64 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de <i>N. gaditana</i> cultivée sous différentes concentrations en bicarbonate de sodium (n=3).....	95
Figure 65 : Variation de la composition biochimique de la souche <i>N. gaditana</i> cultivée sous différentes concentrations en bicarbonate de sodium (n=3).....	96
Figure 66 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de <i>N. gaditana</i> cultivée sous différentes sources d'azote (n=3)	96
Figure 67 : Variation de la composition biochimique de la souche <i>N. gaditana</i> cultivée sous différentes sources d'azote (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$).....	97
Figure 68 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de <i>N. gaditana</i> cultivée sous différentes concentrations d'azote (n=3).....	98
Figure 69 : Variation de la composition biochimique de la souche <i>N. gaditana</i> cultivée sous différentes concentrations en nitrogène (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$).....	99
Figure 70 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de <i>N. gaditana</i> cultivée sous différentes concentrations en phosphate (n=3).....	99
Figure 71 : Variation de la composition biochimique de la souche <i>N. gaditana</i> cultivée sous différentes concentrations en phosphate (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	100
Figure 72 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de <i>Tétranephris brasiliensis</i> cultivée sous différentes concentrations en bicarbonate de sodium (n=3).....	101
Figure 73 : Variation de la composition biochimique de la souche <i>Tétranephris brasiliensis</i> cultivée sous différentes concentrations en bicarbonate de sodium (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	102
Figure 74 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de <i>Tétranephris brasiliensis</i> cultivée sous différentes sources d'azote (n=3).....	102

Figure 75 : Variation de la composition biochimique de la souche <i>Tétranephris brasiliensis</i> cultivée sous différentes sources d'azote (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	103
Figure 76 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de <i>Tétranephris brasiliensis</i> cultivée sous différentes concentrations d'azote (n=3).....	104
Figure 77 : Variation de la composition biochimique de la souche <i>Tétranephris brasiliensis</i> cultivée sous différentes concentrations d'azote (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	105
Figure 78 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de <i>Tétranephris brasiliensis</i> cultivée sous différentes concentrations en phosphate (n=3).....	105
Figure 79 : Variation de la composition biochimique de la souche <i>Tétranephris brasiliensis</i> cultivée sous différentes concentrations en phosphate (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	106
Figure 80 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de <i>Scenedesmus sp.</i> cultivée sous différentes concentration en bicarbonate de sodium (n=3)	107
Figure 81 : Variation de la composition biochimique de la souche <i>Scenedesmus sp.</i> cultivée sous différentes concentrations en bicarbonate de sodium (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	108
Figure 82 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de <i>Scenedesmus sp.</i> cultivée sous différentes sources d'azote (n=3)	108
Figure 83 : Variation de la composition biochimique de la souche <i>Scenedesmus sp.</i> cultivée sous différentes sources d'azote (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	109
Figure 84 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de <i>Scenedesmus sp.</i> cultivée sous différentes concentration d'azote (n=3)	109
Figure 85 : Variation de la composition biochimique de la souche <i>Scenedesmus sp.</i> cultivée sous différentes concentrations d'azote (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	110
Figure 86 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de <i>Scenedesmus sp.</i> cultivée sous différentes concentrations en phosphate (n=3).....	111
Figure 87 : Variation de la composition biochimique de la souche <i>Scenedesmus sp.</i> cultivée sous différentes concentrations en phosphate (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	112
Figure 88 : Détermination du taux de croissance (μ) de la souche <i>Nannochloropsis gaditana</i> cultivée sous différents effluents de pisciculture (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	113
Figure 89 : Variation du pourcentage en protéines de la souche <i>Nannochloropsis gaditana</i> cultivée sous différents effluents de pisciculture (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	113
Figure 90 : Variation du pourcentage en carbohydrate de la souche <i>Nannochloropsis gaditana</i> cultivée sous différents effluents de pisciculture (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	114
Figure 91 : Variation du pourcentage en lipides de la souche <i>Nannochloropsis gaditana</i> cultivée sous différents effluents de pisciculture (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	114
Figure 92 : Variation du pourcentage en chlorophylle a de la souche <i>Nannochloropsis gaditana</i> cultivée sous différents effluents de pisciculture (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	115
Figure 93 : Variation du pourcentage en caroténoïdes de la souche <i>Nannochloropsis gaditana</i> cultivée sous différents effluents de pisciculture (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	115
Figure 94 : Détermination du taux de croissance (μ) de la souche <i>T brasiliensis</i> cultivée sous différents effluents de pisciculture (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	116

Figure 95 : Variation du pourcentage en protéines de la souche <i>T brasiliensis</i> cultivée sous différents effluents de pisciculture (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$).....	116
Figure 96 : Variation du pourcentage en carbohydrates de la souche <i>T brasiliensis</i> cultivée sous différents effluents de pisciculture (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$).....	117
Figure 97 : Variation du pourcentage en lipides de la souche <i>T brasiliensis</i> cultivée sous différents effluents de pisciculture (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$).....	117
Figure 98 : Variation du pourcentage en chlorophylle a (a), chlorophylle b (b) et en caroténoïdes (c) de la souche <i>Tetranephris brasiliensis</i> cultivée sous différents effluents de pisciculture (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$).....	118
Figure 99 : Détermination du taux de croissance (μ) de la souche <i>Scenedesmus sp.</i> cultivée sous différents effluents de pisciculture (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$).....	119
Figure 100 : Variation du pourcentage en protéines de la souche <i>Scenedesmus sp.</i> cultivée sous différents effluents de pisciculture (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$).....	119
Figure 101 : Variation du pourcentage en carbohydrates de la souche <i>Scenedesmus sp.</i> cultivée sous différents effluents de pisciculture (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$).....	120
Figure 102 : Variation du pourcentage en lipides de la souche <i>Scenedesmus sp.</i> cultivée sous différents effluents de pisciculture (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$).....	120
Figure 103 : Variation du pourcentage en chlorophylle a (a), chlorophylle b (b) et en caroténoïdes (c) de la souche <i>Scenedesmus sp.</i> cultivée sous différents effluents de pisciculture (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$).....	121
Figure 104 : Photo d'une cellule de Malassez.....	161
Figure 105 : Vue d'une coupe et de la gravure d'une cellule de Malassez.....	162

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les différents types nutritionnels des microalgues (Cantin, 2010).....	7
Tableau 2 : Eléments majeurs constitutifs des microalgues (Steyer, 2013).....	7
Tableau 3 : Répartition du fractionnement biochimique d'une cellule de microalgue (d'après Sialve and Steyer, 2013)	8
Tableau 4 : Classification de l'espèce <i>Nannochloropsis gaditana</i>	43
Tableau 5 : Classification de l'espèce <i>Tetranephris brasiliensis</i>	44
Tableau 6 : Classification de l'espèce <i>Scenedesmus sp.</i>	45
Tableau 7 : Tableau représentatif des paramètres mesurés au niveau des sites d'échantillonnage. 50	
Tableau 8 : Tableau récapitulatif des paramètres physiques et biochimiques étudié.....	59
Tableau 9 : Fréquence des prélèvements pour chaque analyse.....	60
Tableau 10 : Tableau représentatif des constituants majeurs de l'aliment des poissons.....	61
Tableau 11 : Caractères principaux des microalgues observées	67
Tableau 12 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) des microalgues étudiées cultivées en condition de croissance normale (favorable) (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	71
Tableau 13 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche <i>N gaditana</i> cultivée sous différents flux incidents et différentes photopériodes (n=3), les taux de croissance portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$).	73
Tableau 14 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche <i>N gaditana</i> cultivée sous différentes température (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$).....	75
Tableau 15 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche <i>N gaditana</i> cultivée sous différents pH, (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$).....	76
Tableau 16 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche <i>N gaditana</i> cultivée sous différentes salinités (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$).....	77
Tableau 17 : Détermination du taux de croissance maximale (μ_M), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche <i>N gaditana</i> cultivée sous différentes surfaces spécifiques éclairée (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$).	78
Tableau 18 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche <i>N gaditana</i> cultivée dans deux systèmes de culture distincts (A : miniphotobioreacteur cylindrique), (B : système de culture de type plat) (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$).	80
Tableau 19 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche <i>Tetranephris brasiliensis</i> cultivée sous différents flux incidents et différentes photopériodes (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$).	82
Tableau 20 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche <i>Tetranephris brasiliensis</i> cultivée sous différentes températures (n=3)	83
Tableau 21 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche <i>Tetranephris brasiliensis</i> cultivée sous différents pH (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	84
Tableau 22 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche <i>Tetranephris brasiliensis</i> cultivée	

sous différentes surfaces spécifiques éclairée (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	86
Tableau 23 : Détermination du taux de croissance maximale (μM), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche <i>Tétranebris brasiliensis</i> cultivée dans deux systèmes de culture distinct (A : miniphotobioreacteur cylindrique), (B : système de culture de type plat) (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	87
Tableau 24 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche <i>Scenedesmus sp.</i> cultivée sous différents flux incidents et différentes photopériodes (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	89
Tableau 25 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche <i>Scenedesmus sp.</i> cultivée sous différentes températures (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	90
Tableau 26 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche <i>Scenedesmus sp.</i> cultivée sous différents pH (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	91
Tableau 27 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que la matière sèche (MS) de la souche <i>Scenedesmus sp.</i> cultivée sous différentes surfaces spécifiques éclairées (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	93
Tableau 28 : Détermination du taux de croissance maximale (μM), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche <i>Scenedesmus sp.</i> cultivée dans deux systèmes de culture distincts (A : miniphotobioreacteur cylindrique), (B : système de culture de type plat) (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	94
Tableau 29 : Détermination du taux de croissance (μM), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche <i>N gaditana</i> cultivée sous différentes concentrations de bicarbonate de sodium (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	95
Tableau 30 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximal (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche <i>N gaditana</i> cultivée sous différentes sources d'azote (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	97
Tableau 31 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche <i>N gaditana</i> cultivée sous différentes concentrations de nitrogène (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	98
Tableau 32 : Détermination du taux de croissance maximale (μM), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche <i>N gaditana</i> cultivée sous différentes concentrations en phosphate (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	100
Tableau 33 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche <i>Tétranebris brasiliensis</i> cultivée sous différentes concentrations en bicarbonate de sodium (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	101
Tableau 34 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche <i>Tétranebris brasiliensis</i> cultivée sous différentes sources d'azote (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	103
Tableau 35 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche <i>T brasiliensis</i> cultivée sous	

différentes concentrations d'azote (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	104
Tableau 36 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche <i>Tétranephris brasiliensis</i> cultivée sous différentes concentrations en phosphate (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	106
Tableau 37 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que la matière sèche (MS) de la souche <i>Scenedesmus sp.</i> cultivée sous différentes concentration en bicarbonate de sodium (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	107
Tableau 38 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche <i>Scenedesmus sp.</i> cultivée sous différentes source d'azote (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p < 0,05$)	109
Tableau 39 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche <i>Scenedesmus sp.</i> cultivée sous différentes concentration d'azote (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	110
Tableau 40 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche <i>Scenedesmus sp.</i> cultivée sous différentes concentrations en phosphate (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)	111
Tableau 41 : Qualité des effluents de pisciculture (paramètres physico-chimiques)	112
Tableau 42 : Norme de qualité d'eaux piscicole marocaine	166
Tableau 43 : Normes de qualités d'eaux piscicoles européennes	167

Introduction

La poésie épique d'Homère fait largement référence aux reflets chatoyants des flots marins, dans lesquels le rouge, le mauve, le vert et le noir se joignent à un camaïeu de bleu. Ses protagonistes ne peuvent toutefois pressentir que ces nuances émanent grandement de la présence d'organismes vivants microscopiques. Le monde aquatique abrite pourtant une grande biodiversité d'organismes (Mocquet, 2009), parmi lesquels les autotrophes planctoniques (microalgues) responsables de la moitié de la production primaire planétaire, utilisant l'énergie lumineuse pour assimiler des substances inorganiques (nutriments).

Les microalgues figurent parmi les premières créatures vivantes, apparues voici environ 3,5 milliards d'années, colonisant la quasi-totalité des écosystèmes de la planète : des océans aux glaciers, en passant par les lacs hyper-salés, les sols, les roches et les arbres (Riebesell et al., 2007) et constituant le premier maillon indispensable à notre survie sur la terre. En effet, elles sont les premiers producteurs d'oxygène et de matière organique, maillon fondamental de la chaîne alimentaire, mais également premier consommateur de dioxyde de carbone, donc jouant un rôle dans la stabilité du climat.

L'intérêt de ces micro-organismes réside d'une part, dans leur capacité à substituer du carbone fossile par du carbone renouvelable ; tendance forte impulsée par les consommateurs et la société civile et dans leur exceptionnelle productivité surfacique permettant de conserver pour des usages prioritaires des ressources naturelles rares (terres agricoles et eau), et sont de ce fait porteuses de promesses d'avenir. A l'heure où, en raison des dérèglements climatiques et de la raréfaction des ressources pétrolières (Hook and Tang, 2013), l'utilisation des combustibles fossiles comme source majeure d'énergie est largement contestée, ces micro-organismes font l'objet d'une attention croissante dans le domaine des bioénergies (Chisti, 2008 ; Wijffels and Barbosa, 2010). Leur forte productivité, des taux de croissance élevés (le temps de doublement peut être de seulement 3,5 heures (Gordon and Seckbach, 2012)), largement supérieurs à ceux des plantes terrestres, ainsi qu'une capacité pour certaines espèces à stocker d'importantes quantités de lipides les ont positionnés comme une source prometteuse de biocarburants dits de troisième génération (Mata et al., 2010). Et d'autre part, dans l'étendue de la palette de molécules qu'elles peuvent produire, telles que les antioxydants, les pigments, les acides gras polyinsaturés à longues chaînes ou les vitamines, ces micro-organismes se retrouvent, de ce fait, au croisement des branches industrielles de l'agroalimentaire, de la cosmétique, de la chimie ainsi que l'industrie pharmaceutique. La biotechnologie microalgale est donc devenue un thème de recherche privilégié permettant d'explorer et d'exploiter l'énorme potentiel de ces micro-organismes intervenant au sein de nombreux systèmes et dans de multiples secteurs (Chisti, 2007).

Néanmoins, malgré cet intérêt croissant pour la valorisation des microalgues depuis la moitié du 20^{ème} siècle, leur exploitation industrielle reste limitée, de nombreux verrous technologiques subsistent et doivent être levés afin d'augmenter les rendements, réduire les coûts, et assurer ainsi la viabilité économique de la filière. En effet Les microalgues subissent passivement les variations des conditions de croissance. La lumière, la concentration en nutriments, la température, le pH et l'hydrodynamisme sont autant de facteurs qui agissent de concert sur leur métabolisme. Dans l'hypothèse actuelle d'un changement global de ces conditions, l'étude de la réponse physiologique des microalgues est primordiale pour prévoir celle de l'écosystème entier (Mocquet, 2009). Dans les pays méditerranéens, ces atouts et ces contraintes génériques sont amplifiés par des conditions naturelles et socio-économiques bien identifiées (biodiversité, énergie solaire, potentiel de croissance économique d'une part, réchauffement climatique, insécurité alimentaire, déficit institutionnel d'autre part) (Rastoin, 2016).

Le présent travail s'intègre dans cette démarche globale, en se focalisant sur la première étape (optimisation des paramètres physico-chimiques) dans le développement du processus de production en masse des microalgues par :

- L'isolement, la purification et l'identification de microalgues algériennes : la première étape dans l'étude de la biodiversité, au sens de diversité spécifique, consiste en l'identification des espèces colonisant le milieu étudié tout en prenant en compte leur abondance, ces identifications sont réalisées par observation au microscope électronique à balayage (MEB) ainsi que par des techniques de biologie moléculaire.
- La validation des performances en croissance des souches dans des conditions de culture optimales et défavorables (effet des paramètres physico-chimiques) : si l'on utilise directement les microalgues naturelles, on n'a pas de question technique à se poser sur le procédé. Mais pour une filière de production industrielle, il faut comprendre en détail et contrôler ce que fait la nature et pouvoir l'extrapoler, éventuellement en apportant des modifications aux microalgues. Les processus biologiques sont dépendants les uns des autres, par le moyen de signalisations biologiques. Celles-ci peuvent être orientées par action sur les métabolismes. On peut ainsi amener le micro-organisme (la microalgue) à stocker les produits synthétisés soit sous forme de corps lipidiques, qui ne sont pas essentiels pour lui mais "mis en réserve" pour son avenir, soit sous forme de grains d'amidon. Un de nos objectifs est de comprendre la manière dont le micro-organisme stocke ces réserves énergétiques sous une forme ou sous une autre, et avec quelle efficacité (Legrand, 2010).
- L'élaboration d'un système de culture à l'échelle pilote : le fonctionnement du photobioréacteur fait intervenir l'absorption des photons, les réactions biologiques au sein des microalgues dont le métabolisme peut être orienté par les conditions opératoires, les réactions chimiques autour de l'assimilation des nutriments à travers de multiples réactions enzymatiques. Toutes ces réactions ont leurs cinétiques propres et doivent être contrôlées. Les aspects physiques, notamment l'incorporation d'une source de carbone dans les milieux de culture, la valeur de la surface spécifique éclairée ainsi que la géométrie du photobioréacteur, sont également essentiels.
- L'utilisation de milieu de culture non conventionnel : les microalgues possèdent un potentiel biotechnologique évident mais comme il subsiste toujours quelques incertitudes quant à la rentabilité de leur production, son essor doit être accompagné par un effort de recherche, afin d'en réduire les coûts et fiabiliser les rendements des cultures à l'échelle industrielle. En vue de réduire ces montants, des efforts de recherche respectueuse de l'environnement doivent être accomplis (Bougaran and Saint-Jean, 2014).

Ce travail s'articule pour cela en cinq chapitres qui aborderont successivement la recherche et la caractérisation de souches d'intérêts, puis l'optimisation de la croissance et de la production de molécules à hautes valeurs ajoutées.

Le premier chapitre est une étude bibliographique consacrée à une présentation générale des microalgues ainsi que de leurs possibilités d'exploitation : production de biomasse, production de molécules à haute valeur ajoutée et applications environnementales. Une description des systèmes de production de microalgues est également présentée.

Le deuxième chapitre porte sur la démarche scientifique adoptée (matériel et méthodes) et décrit les outils expérimentaux utilisés durant la préparation de cette thèse (méthodes analytiques et bio essais) ainsi que les organismes modèles et leur pertinence dans l'étude.

Enfin, seront exposés les paramètres physico-chimiques testés ainsi que les outils statistiques employés.

Ensuite, le troisième chapitre est consacré à la présentation des résultats obtenus au cours de cette thèse. Les conditions optimales de cultures y sont décrites ainsi que leur effet sur la concentration des quatre grandes catégories de macromolécules de la biologie constituant les microalgues : les protéines, les carbohydrates (amidon, sucres, glucose, polysaccharides), les lipides (glycérols, acides gras saturés ou non) et les pigments.

Le quatrième chapitre de ce mémoire est dédié à la discussion, c'est le lieu pour une rédaction plus poussée et plus interprétative des résultats, elle nous permet d'évaluer notre recherche : par exemple en discutant de nos attentes sur les causes et conséquences des résultats, leurs possibles limitations, ou encore en émettant des suggestions sur les recherches supplémentaires. Le but de cette partie est donc d'expliquer les résultats obtenus.

Enfin, le dernier chapitre de cet ouvrage permet de tirer un bilan global des différents travaux réalisés durant cette thèse et de proposer des perspectives de travail basées sur nos résultats en tenant compte des éventuelles limites des différentes études réalisées pour assurer la continuité du sujet abordé.

Chapitre I - Etat de l'art et objectifs de l'étude

I.1. Généralités sur les microalgues

Les algues sont des organismes photosynthétiques qui se développent en suspension principalement dans des solutions aqueuses (Wen and Johnson, 2009), et qui sont capables de convertir l'énergie lumineuse et une source de carbone le dioxyde de carbone ou « CO_2 » en un ensemble de matières organiques ou « biomasse ». On distingue deux catégories principales d'algues : les « macroalgues » et les « microalgues ».

Comme son nom l'indique, les microalgues sont des organismes microscopiques non visibles à l'œil nu. Leur taille est de l'ordre de quelques micromètres. Leur existence est révélée lors d'une proliférations massives (blooms) dues à des conditions favorables formant parfois des "eaux colorées" en rouge, brun ou vert.

Dans la nature, il existe une biodiversité très vaste de microalgues. On estime le nombre d'espèces existantes entre 200000 et plusieurs millions, ce qui est très supérieur aux 250000 espèces de plantes supérieures recensées. Une telle diversité non exploitée constitue un réel potentiel pour la recherche et l'industrie. Ces microorganismes photosynthétiques sont considérés comme les premiers producteurs d'oxygène indispensable à la respiration de la majorité des êtres vivants. Leur existence remonte dans les océans à plus de trois milliards d'années, ils sont à l'origine de la transformation de la composition atmosphérique (fixation de CO_2 et rejet de O_2) et ont permis la vie végétale et animale sur notre planète. Souvent désignées sous la dénomination de "*Phytoplankton*" (Sumi, 2009), les microalgues représentent une source d'alimentation pour les premières étapes larvaires (Coutteau et al., 1997) comme pour les êtres humains de par leur composition biochimique adaptée (Brown et al., 1997). Ces micro-usines photosynthétiques présentent des caractéristiques similaires aux plantes terrestres, mais leur structure morphologique permettant une meilleure accessibilité de l'eau, du dioxyde de carbone et des autres nutriments, leur permet d'avoir une efficacité photosynthétique supérieure (Carlsson et al., 2007).

I.1.1. Caractéristiques

Les microalgues présentent des formes variables, souvent sphériques (*porphyridium*), en forme de croissant (*Clostridium*), de spirale (*Arthrospira*), de gouttelette (*chlamydomonas*) et même d'étoile (*Staurastrum*).

En réalité, les microalgues sont des micro-organismes composés d'une seule cellule contenant deux « centrales énergétiques » essentielles à leur croissance : le chloroplaste qui est le siège de la photosynthèse et les mitochondries qui sont les sièges de la respiration. Chacun de ces deux processus sera détaillé dans l'ensemble des paragraphes suivants afin de bien élucider le métabolisme entier des microalgues.

Les microalgues peuvent mesurer de quelques microns à plusieurs centaines de microns, selon les espèces. Elles ont la capacité d'effectuer la photosynthèse oxygénique (convertir de manière biologique l'énergie lumineuse en liens énergétiques chimiques, qui sont ensuite accumulés sous forme de composés organiques (Falkowski and Raven, 2007)). Cette réaction photosynthétique forme également de l'oxygène gazeux.

Les différents groupes de microalgues possèdent généralement plusieurs pigments photosynthétiques, toutes contiennent de la chlorophylle *a* (*chl_a*), qui peut être complétée selon les classes et les espèces par des chlorophylles *b*, *c*, ou *d* et divers caroténoïdes. On peut distinguer deux types de pigments, les pigments photosynthétiques et les pigments non-photosynthétiques.

C'est dans les chloroplastes, et plus précisément dans les membranes thylacoïdes, que se déroule la réaction d'oxydoréduction qui permet de réduire le dioxyde de carbone à partir de l'hydrogène de l'eau en sucres simples et en oxygène. La figure 1 présente les principales structures des cellules algales eucaryotes. La membrane plasmique est une structure composée de polysaccharides et de protéines plus ou moins complexes et en proportions variables selon les espèces (Van Den Hoek, 1995).

Elle est chargée négativement, ce qui est attribuable à la composition des groupes fonctionnels qui y sont associés. Elle confère aux cellules une certaine résistance aux ions métalliques potentiellement toxiques, ce qui motive leur utilisation pour le traitement des eaux (Monteiro et *al.*, 2012).

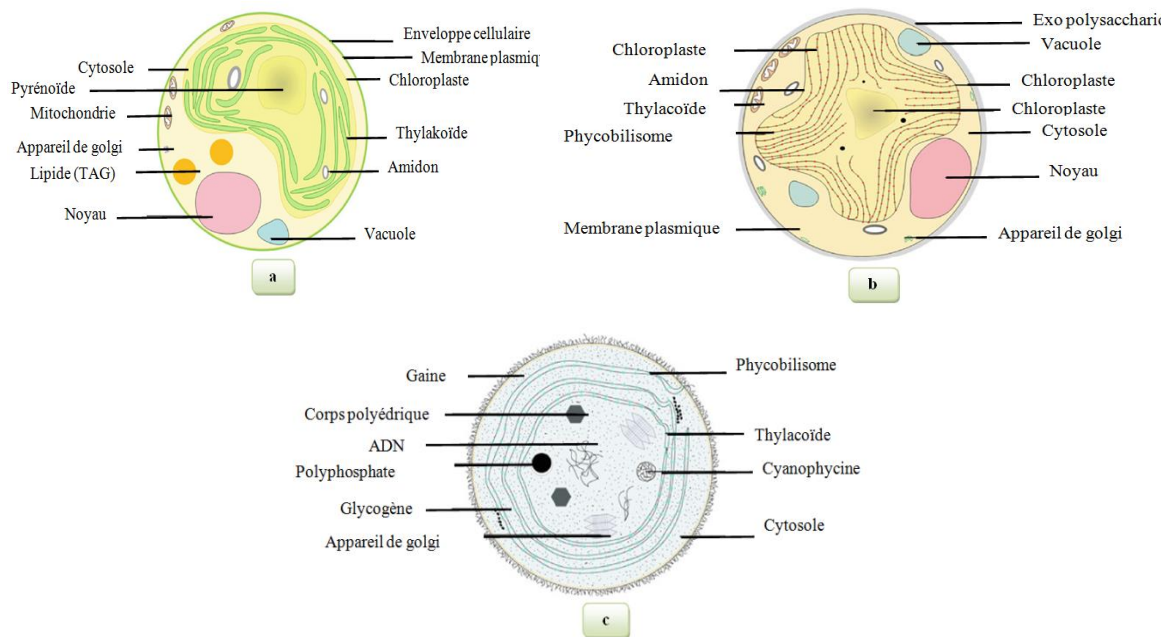


Figure 1 : Ultrastructure de microalgues (Pignolet et *al.*, 2013). Cellules de microalgues : verte (a), rouge (b) et cyanobactérie (c)

I.1.2. Distribution et Habitats

Au cours de leur évolution, les microalgues ont pu coloniser la quasi-totalité des niches écologiques (figure 2). Leurs capacités d'adaptation et de survie sont telles qu'elles sont aptes à coloniser tous types de milieux, on les trouve aussi bien dans les eaux thermales que dans les glaces, dans les eaux acides ou encore hyper salées, dans les grottes, associées sous forme de symbioses avec tout type d'organisme vivant et même parasites entre autres de l'homme. Elles sont également capables de se développer sur des surfaces rigides, telles que les murs ou les troncs d'arbres et même sur les structures immergées (Becerra Celis, 2009). Certaines espèces peuvent supporter des températures très faibles ou paradoxalement extrêmes (Couté, 1995). Cette faculté d'adaptation est le résultat de leurs propriétés morphologiques ainsi que de leur capacité de synthèse de différentes variétés de métabolites secondaires (Becerra Celis, 2009).

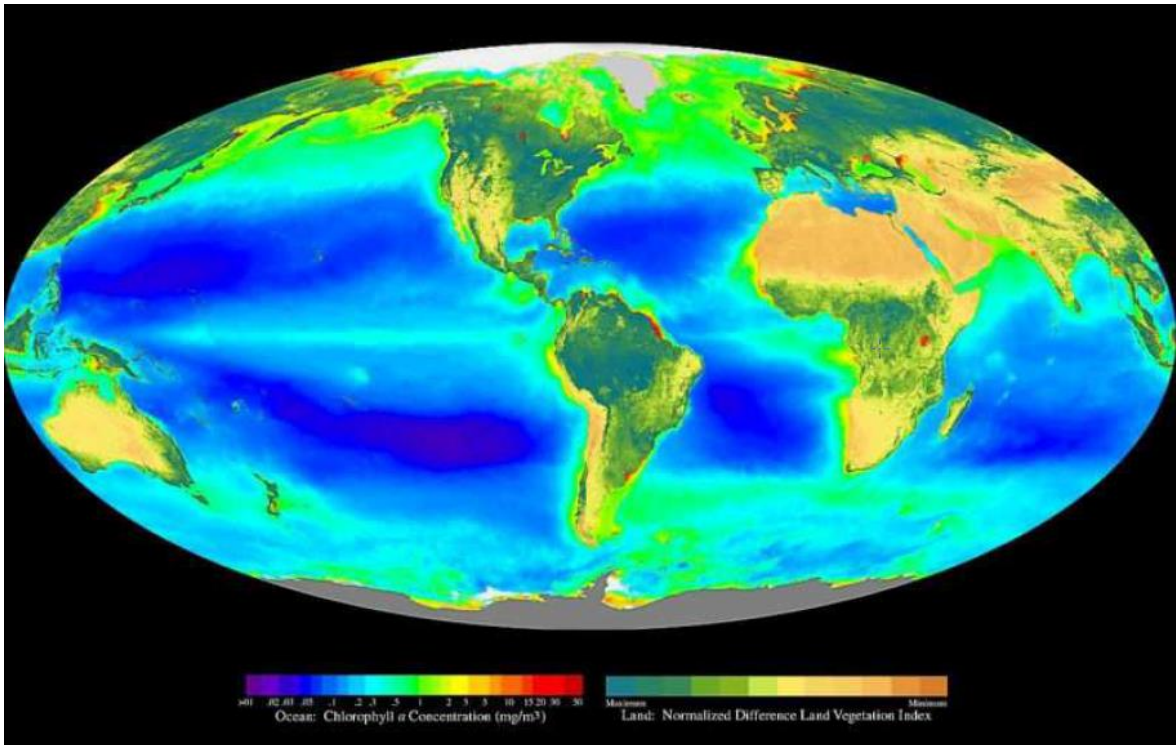


Figure 2 : photo du globe vu par image satellite montrant les zones riches en phytoplancton (en vert)
([hppt://www.safer-la-reunion.asp](http://www.safer-la-reunion.asp))

I.1.3. Composition et Modes de nutrition

I.1.3.1. Mode autotrophe

Les microalgues sont largement et principalement connues comme étant des organismes photoautotrophes (Legrand, 2007), le carbone inorganique pourra être introduit dans la culture sous forme gazeuse (CO_2) ou directement dans le milieu de culture sous forme de carbonate (HCO_3^-). Par rapport à d'autres mélanges gazeux (d'origine industrielle), l'air est relativement peu concentré en CO_2 (de l'ordre de 390 ppmv), un apport supplémentaire va favoriser une croissance non limitée par le carbone et permettre d'atteindre des productivités plus importantes. Les effluents gazeux industriels issus de combustion constituent un gisement en carbone inorganique intéressant d'un point de vue économique et environnemental. En considérant que le carbone compte pour 50% de la biomasse sèche des microalgues, nous pouvons en effet calculer à partir de la stoechiométrie de la photosynthèse, que 1,8 g de CO_2 permettra de produire environ 1 g de biomasse sèche.

I.1.3.2. Mode hétérotrophe

Certaines espèces ont la capacité d'assimiler directement du carbone organique produit par d'autres organismes. Dans cette voie hétérotrophe, l'incorporation de carbone dans la cellule est plus coûteuse d'un point de vue énergétique et entraîne des taux de croissance plus faible. Les substrats organiques « simples » préférentiels sont le glucose et l'acétate, bien plus intéressants d'un point de vue économique, les mélasses et effluents d'activité sucrière et laitière ont été également utilisés avec succès (Bumbak et al., 2011). 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 (Lorne, 2011).

I.1.3.3. Mode mixotrophe

La mixotrophie se définit comme la capacité des organismes à assimiler à la fois du carbone inorganique et du carbone organique. Le taux de croissance spécifique global sera sensiblement égal à la moyenne des taux de croissance obtenu dans les deux types trophiques. Cette propriété métabolique avantageuse est exploitée dans les filières industrielles de production de microalgues et de co-produits à haute valeur ajoutée (Lee, 2004).

Le tableau 1 représente les différents types nutritionnels des microalgues.

Tableau 1 : Les différents types nutritionnels des microalgues (Cantin, 2010)

Mode de nutrition	Source d'énergie	Source de carbone
Photo-autotrophe	Radiation solaire	CO ₂ seulement
Photo-hétérotrophe	Radiation solaire	CO ₂ et CO
Chemo-autotrophe	Composé inorganique	CO ₂
Chemo-hétérotrophe	Composé organique	Carbone organique

I.1.4. Eléments majeurs constitutifs des microalgues

Les besoins nutritifs des microalgues sont similaires à ceux des plantes supérieures (Becker, 1994).

Redfield (1934) a proposé une composition élémentaire C : N : P de 106 :16 :1. Cette composition est relativement constante dans le milieu naturel. Défini par Vonshak (1986) le milieu de culture devra satisfaire les besoins en éléments majeurs (ou macroéléments) C, H, N, O, P, S et en micro-éléments encore appelés éléments traces. Le tableau suivant (tableau 2) indique des ordres de grandeurs pour les éléments majeurs constitutifs des microalgues.

Tableau 2 : Eléments majeurs constitutifs des microalgues (Steyer, 2013)

Elément	Composition cellulaire µg/mg du poids sec	Elément	Composition cellulaire µg/mg du poids sec
C	176-650	Mg	0,5-75
O	205-330	Fe	0,2-34
H	29-100	Zn	0,005-1
N	10-140	Mn	0,02-0,24
Na	0,4-47	Si	0-230
K	1-75	B	0,001-0,25
P	0-80	Mo	0,0002-0,001
S	1,6-16	Cu	0,006-0,3
Co	0,0001-0,2		

Enfin, le fractionnement biochimique se répartit suivant 4 familles de molécules: protéines, lipides, sucres et acides nucléiques (tableau 3). Cette composition dépend des espèces et des conditions de culture.

Tableau 3 : Répartition du fractionnement biochimique d'une cellule de microalgue (d'après Sialve and Steyer, 2013)

Compartiment	Fonction	Ordre de grandeur (% massique)
Protéines	Structure et métabolisme	40-60
Lipides	Structure et réserve énergétique	5-60
Sucres	Structure et réserve énergétique	8-30
Acides nucléiques	Support, vecteur et régulateur de l'information génétique	5-10

I.1.5. Diversité et classification des microalgues

Les microalgues constituent un groupe extrêmement diversifié, rassemblé autour d'une cohérence physiologique : la photosynthèse oxygénique (Andersen, 1992). Cette famille rassemblerait de plusieurs centaines de milliers à plusieurs millions d'espèces, parmi les quelles 47000 espèces sont décrites (Sharma and Rai, 2011) et seulement cinquante d'entre elles étudiées de manière détaillée dans les laboratoires de recherche et une dizaine d'espèces exploitées au niveau industriel et commercial (Hu et al., 2008). Elles ne sont pas 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 (Fogg, 1953), la nature de leur cycle de vie, la nature chimique des produits photosynthétiques de réserve (produit d'accumulation intracellulaire), l'organisation de leurs membranes photosynthétiques (Carlsson et al., 2007) ou leur pigmentation. On distingue principalement deux grands groupes de microalgues.

I.1.5.1. Les procaryotes

Ce sont des organismes unicellulaires dépourvus de noyau et ne présentent que très rarement des organites cellulaires.

- **Les cyanophycées**

Appelées également cyanobactéries, sont des microalgues procaryotes de coloration bleue-verte qui présentent une forte tolérance vis-à-vis des températures extrêmes (Pulz et al., 2004). Elles sont approximativement 2000 espèces dans ce groupe (Alcaine, 2010) pouvant être divisées en 150 genres. Ces microalgues sont répandues dans toutes les variétés d'habitats aquatiques. Les espèces les plus connues sont *Spirulina (Arthrospira) plantensis*, *Nostoc commune* et *Aphanizomenomflos-aquae* (Pulz et al., 2004).

- **Les prochlorophyta**

Présente une spécificité au niveau de la pigmentation avec une absence totale de phycobiliprotéines, mais une présence de chlorophylle *a* et *b* (Pulz et al., 2004).

I.1.5.2. Les eucaryotes

Ce sont des organismes uni ou pluricellulaires qui présentent une structure complexe contenant un noyau entouré d'une membrane ainsi que plusieurs organites intracellulaires.

- **Les bacillariophycées (diatomées)**

Les diatomées sont considérées comme majoritaires, constituent le groupe dominant du règne des microalgues avec plus de 100000 espèces connues. Elles se distinguent des autres groupes par leur carapace de silicium et leur diploïdie. Elles mesurent de

2 µm à 1 mm. Elles emmagasinent leurs réserves sous forme de chrysolaminarine, un polysaccharide, ainsi que sous forme d'huiles, elles sont d'ailleurs reconnues pour leur contenu en acides gras et sont responsables de 20% de la production carbonée océanique (Kroth et *al.*, 2008).

- **Les dinophycées (dinoflagellées)**

Les dinoflagellés sont des microalgues unicellulaires de couleur rouge-orangé et de taille moyenne ou petite, entre 3 et 50 microns. Leurs deux flagelles leur permettent d'effectuer des déplacements tournoyants et des migrations verticales. Dans le cas des dinoflagellés de métabolisme hétérotrophe, les flagelles deviennent alors un moyen leur permettant de capturer les matières organiques qui se trouvent dans leur environnement. Cette classe regroupe beaucoup de microalgues toxiques. Ainsi, trois espèces principales de dinoflagellés sont redoutées : *Dinophysis* (50 microns) qui contient des toxines (DSP : *Diarrhetic Shellfish Poison*) responsables des troubles gastro-intestinaux chez l'homme, *Alexandrium* (de 20 à 25 microns) qui produit des toxines paralysantes (PSP : *Paralytic Shellfish Poison*) et *Gymnodinium* (entre 20 et 25 microns) qui libère des toxines ayant une influence directe sur la faune marine, comme une perte d'appétit.

- **Les rhodophycées (microalgues rouges)**

Les rhodophycées se distinguent par leurs plastes appelés « rhodoplastes » colorés en rouge par les phycobiliprotéines (pigments surnuméraires), la présence des synapses entre les cellules et d'amidon floridéen. Ces algues sont retrouvées plutôt dans les eaux salées (ex., *Porphyridium*) et les eaux saumâtres mais très rarement dans les eaux douces. Cette classe comprend près de 400 espèces présentant dans la majorité des cas un métabolisme photoautotrophes ou photoorganotrophes. Bien que certaines espèces contiennent des acides gras, leur utilisation pour produire du biodiesel en absence de lumière ne semble pas envisageable. (Lechevalier et *al.*, 1977).

- **Les chlorophycées (microalgues vertes)**

Les chlorophycées sont retrouvées dans tous types d'habitat. L'amidon et l'huile constituent leurs principales réserves énergétiques. Parmi ce groupe, plusieurs microalgues possèdent un métabolisme photoautotrophe, photohétérotrophe et chemohétérotrophe. On dénombre actuellement 8000 espèces, dont 1000 sont des chlorophytes marines (Alcaine, 2010).

Une des espèces les plus répandues est *Chlorella vulgaris*, une espèce très intéressante pour la production de biodiesel en raison de sa teneur en acides gras. On trouve également *Chlamydomonas reinhardtii* qui est une espèce modèle dans de nombreuses études de laboratoire, *Dunaliella* ainsi que *Haematococcus* (Pulz et *al.*, 2004).

- **Les chrysophycées**

Ce sont des algues dorées qui se répandent essentiellement dans les eaux douces. On répertorie environ 1000 espèces avec des caractéristiques similaires à celles des diatomées du point de vue pigmentation et structure biochimique (Alcaine, 2010).

- **Les euglenophycées**

Elles sont répandues dans les eaux saumâtres et douces. On compte plus de 800 espèces qui présentent des réserves constituées essentiellement d'une substance glucidique, le « paramylon », et d'huile.

- **Les prymnésiophycées (les haptophycées)**

Les microalgues de ce groupe sont caractérisées par la présence d'un appendice filamenteux nommé l'haptonème entre deux flagelles lisses. Ce dernier contient des microtubules, dont la taille varie selon l'espèce, et qui permettrait l'adhésion à un substrat, le déplacement voire la capture de proies. Parmi les genres appartenant à cette famille on peut citer *Chrysochromulina*.

- **Les eustigmatophyceae**

Ce groupe constitue une petite division des microalgues, considérée comme une lignée distincte (Adl et al., 2005). Ces microalgues se distinguent par leur coloration vert-jaunâtre due à leur composition spécifique en pigments. En effet, elles contiennent des chlorophylles de type a, sans chlorophylle b et c, et des principaux pigments accessoires comme les violaxanthine et vaucheriaxanthin.

Le nombre d'espèces appartenant à cette classe diffère selon les sources d'information. Selon Pribyl et al., (2012), la classe comporte environ 20 espèces regroupées dans 11 genres. Tous les membres sont des microalgues unicellulaires avec un ou plusieurs plastes pariétaux de couleur vert-jaunâtre, vivant individuellement ou en colonies.

Leur environnement d'origine est le sol et l'eau douce. Seul le genre *Nannochloropsis* renferme des espèces marines caractérisées par leurs petites tailles (2-4 µm). La plupart des cellules des eustigmatophytes ont une forme coccoïde, c'est le cas de *Nannochloropsis*. Il existe également d'autres morphologies cellulaires (ex., ovale, ellipsoïdale ou irrégulière).

I.1.6. La photosynthèse

Près de la moitié de l'activité photosynthétique sur terre est réalisée par des organismes aquatiques qui ne représentent pourtant que 1% de la biomasse totale (Falkowski and Raven, 2007). La photosynthèse qui signifie littéralement « synthèse réalisée à l'aide de l'énergie lumineuse » est le processus par lequel les microalgues transforment l'énergie lumineuse en énergie chimique et fixent le carbone inorganique dissous (CID) (figure 3). Il en résulte la synthèse de matière organique et la production d'oxygène. Ainsi l'activité photosynthétique est la fixation du CO_2 et la production d' O_2 via les mécanismes de la photosynthèse.

Elle se compose de deux phases indépendantes chimiquement et physiquement, mais liées par des intermédiaires communs et des régulations enzymatiques.

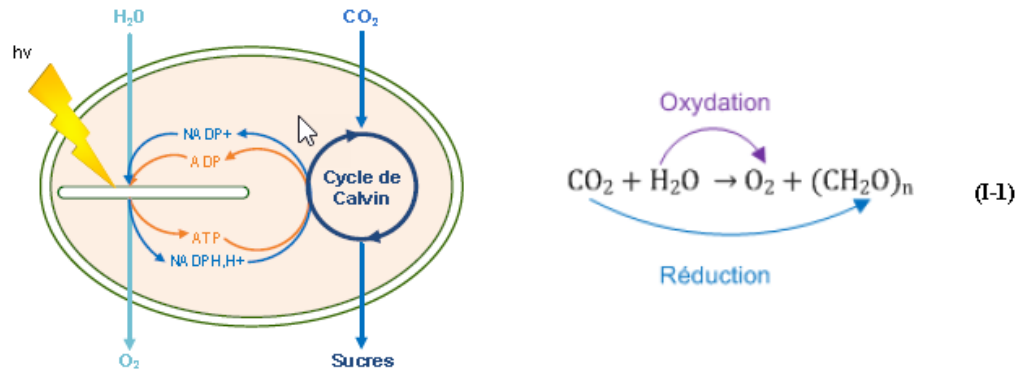


Figure 3 : La photosynthèse (réaction globale) (Falkowski and Raven, 2007)

La photosynthèse se déroule dans les membranes thylacoïdiennes des chloroplastes où sont situés des pigments photorécepteurs (chlorophylles, caroténoïdes) (figure 4). Le chloroplaste est un organe typique des cellules végétales et a pour principal composant la chlorophylle (pigment vert), il est composé d'une phase aqueuse (stroma) et de couches de membranes lipoprotéiques : les thylacoïdes. Les thylacoïdes sont des « lamelles » disposées parallèlement à l'axe principal du chloroplaste, la membrane thylacoïdienne forme une vésicule plate, formant un espace intra-thylacoïdien : le lumen. Les membranes thylacoïdiennes sont majoritairement composées d'acides gras polyinsaturés (Hu, 2004).

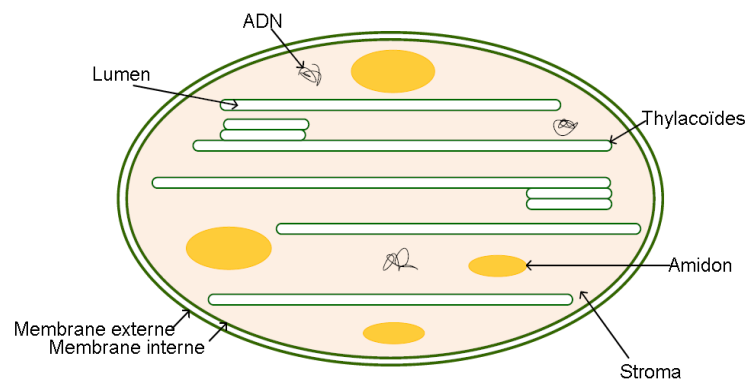


Figure 4 : Structure d'un chloroplaste (Hu, 2004)

La photosynthèse permet la transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique grâce à la chaîne photosynthétique et au cycle de Calvin, cette dernière se déroule en deux phases :

La phase photochimique dite éclairée (chaîne photosynthétique) qui dépend directement de la lumière : phase de conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique au niveau des membranes thylacoïdiennes.

La phase dite obscure (cycle de Calvin), non dépendante directement de la lumière : phase de synthèse de matière organique (sucres) à partir de produits issus de la phase photochimique et du CO₂ atmosphérique dans le stroma du chloroplaste.

I.1.6.1. Phase photochimique

La phase photochimique est la phase dite éclairée de la photosynthèse, elle se déroule dans les membranes thylacoïdiennes, en présence de lumière. La captation de l'énergie lumineuse s'effectue grâce aux pigments photorécepteurs présents dans la membrane des thylacoïdes. Les pigments majoritairement présents sont la chlorophylle et les caroténoïdes (comme le

bêta-carotène). Ces pigments sont regroupés dans les photosystèmes pour capter au mieux la lumière. Un photosystème est une entité composée d'une antenne et d'un centre réactionnel. L'antenne, intégrée dans la membrane thylacoïdienne, est composée de centaines de pigments associés à des protéines et des lipides.

I.1.6.1.1. La lumière, source d'énergie des microalgues

La lumière est un rayonnement électromagnétique, le rayonnement utile à la photosynthèse, appelé PAR (de l'anglais, Photosynthetically Active Radiation), a une longueur d'onde comprise entre 400 et 700 nm et qui correspond plus au moins à la plage de longueur d'onde de la lumière visible (figure 5).

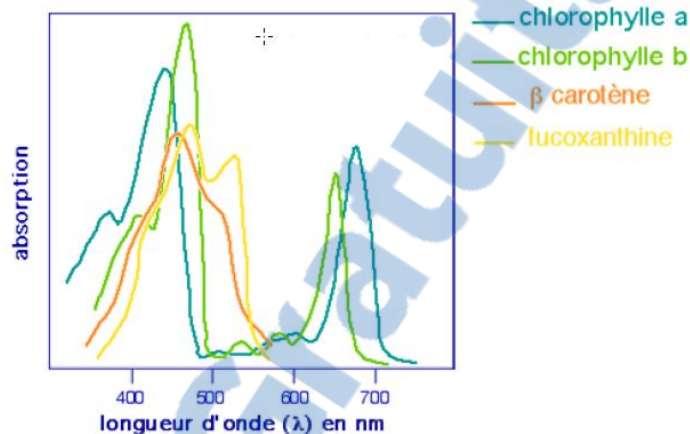


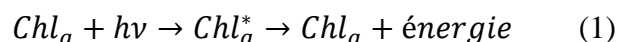
Figure 5 : Spectre d'absorption des pigments photosynthétiques (Tang *et al.*, 2011)

Plus spécifiquement, le spectre d'absorption de la chlorophylle est majoritairement le bleu et le rouge, avec un maximum d'absorption à 678 nm. Les caroténoïdes absorbent le plus de rayonnement entre 400 et 600 nm (avec un maximum à 440 nm (Richmond, 2004)).

Les photosystèmes des microalgues n'exploitent pas l'ensemble du PAR mais seulement 35 à 45% du rayonnement solaire. De plus, la photosynthèse de la plupart des microalgues est saturée à 30% des rayonnements solaires totaux soit un rayonnement de 1700 à 2000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Tang *et al.*, 2011).

I.1.6.1.2. Fonctionnement d'un photosystème et de la captation de l'énergie lumineuse

Le photosystème est le lieu de la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique. Lorsqu'un photon d'énergie $h\nu$ frappe un pigment, il provoque le déplacement d'un électron vers une orbite atomique plus externe. Ce déplacement d'électron provoque un changement d'état de la chlorophylle qui va passer d'un état fondamental (chl_a) à un état dit excité ou instable, c'est-à-dire porteur d'énergie. Quand la chlorophylle excitée revient à son état fondamental, l'énergie emmagasinée est réémise sous forme de chaleur, de fluorescence ou d'énergie d'activation d'un autre pigment.



Le pigment contigu est excité à son tour et l'énergie libérée va exciter un autre pigment et ainsi de suite jusqu'au centre réactionnel du photosystème où une chlorophylle dite « piège » est excitée et va émettre un électron (équation (1)). La chlorophylle piège sera alors oxydée (chl_a^*). L'eau, par son oxydation, permettra à la chlorophylle de retrouver son état fondamental. L'électron émis va être pris en charge par différents couples d'oxydoréduction et va former la chaîne photosynthétique qui est un flux d'électron dans la membrane thylacoïdienne.

L'état excité d'un pigment dure très peu de temps (10^{-13} à 10^{-18} s) et la molécule retourne ensuite à son état fondamental.

I.1.6.1.3. Principe de la chaîne photosynthétique

Le rôle principal des réactions de la phase photochimique est de créer un réducteur biochimique : le NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucleotide Phosphate) et un composé hautement énergétique : l'ATP (Adénosine TriPhosphate). Ces deux molécules sont nécessaires pour l'assimilation du carbone inorganique (Hu, 2004).

La chaîne photosynthétique est composée de trois complexes macromoléculaires intégrés dans la membrane thylacoïdienne : le photosystème II (PS II), le complexe cytochrome b6/f et le photosystème I (PS I). La translocation des électrons entre les différents complexes s'effectue par de petites molécules, transporteurs d'électrons et de photons : les plastoquinones, plastocyanines et ferrédoxines (figure 6). Le transfert d'électron se fait en passant d'un couple rédox faible vers un potentiel redox plus élevé (figure 7).

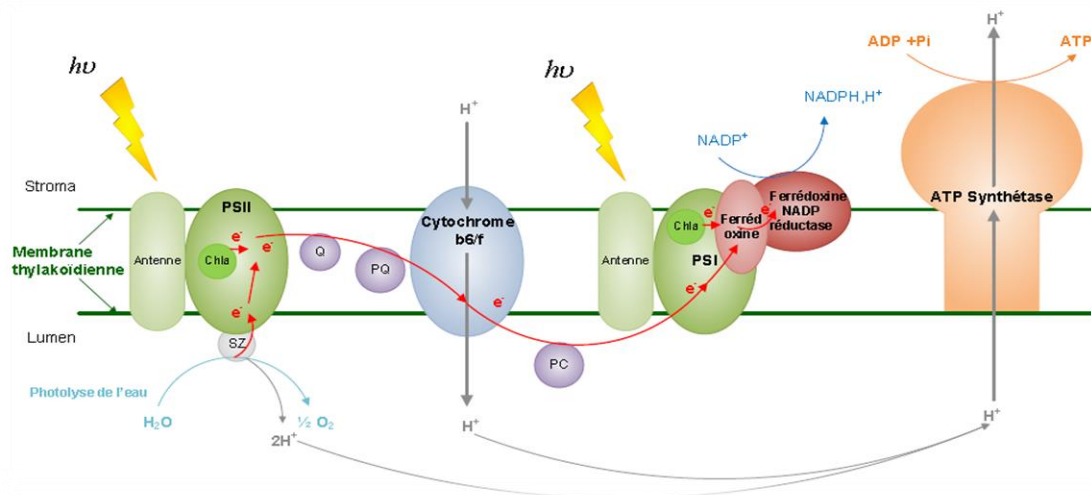


Figure 6 : La chaîne photosynthétique (Hu, 2004)

La chaîne photosynthétique commence par un impact lumineux sur une antenne de réception accolée au photosystème II. Les photons captés, d'une longueur d'onde comprise entre 400 et 700 nm, excitent les pigments jusqu'au centre réactionnel où la chlorophylle piège passe dans un état excité puis oxydé, libérant ainsi un électron. Le centre réactionnel du PS II fonctionne à un équivalent énergétique d'un photon à 680 nm et est nommé P680.

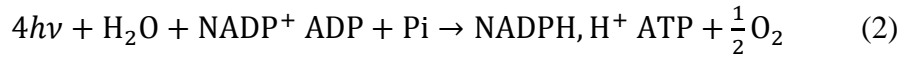
L'énergie excédentaire contenue par les photons des longueurs d'ondes inférieures est réémise sous forme de chaleur ou de fluorescence. Le retour de la chlorophylle piège oxydée à un état fondamental s'effectue en réaction avec un complexe SZ qui va simultanément oxyder l'eau. L'oxydation de l'eau (ou photolyse) va produire de l'oxygène, des électrons et des protons.

Les électrons issus de la photolyse de l'eau vont rejoindre les électrons issus de l'impact lumineux. Ces électrons sont transférés vers le complexe b6/f par des quinones (Q) puis des plastoquinones (PQ). Ce transfert spontané exergonique (qui libère de l'énergie) est couplé par un trajet endergonique de protons du stroma vers le lumen au niveau du complexe b6/f.

Les électrons sont ensuite transférés par la plastocyanine (PC), qui opère dans le lumen, vers le photosystème I (PS I). Le PS I fonctionne à un équivalent énergétique d'un photon à 700 nm et fonctionne comme le photosystème II. Les électrons sont transférés à la ferrédoxine puis à la ferrédoxine NADP réductase qui va réduire le $NADP^+$ en NADPH.

L'accumulation des protons, venant de la photolyse de l'eau et du pompage par le complexe b6/f entraîne un gradient de protons dans le lumen du thylacoïde. Ce gradient va générer une force proton-motrice qui peut être utilisée pour la formation d'ATP. Le gradient entraîne donc le passage spontané des protons par l'ATP synthétase, formant ainsi de l'ATP. Cette formation d'ATP, dépendante de la lumière est appelée phosphorylation.

L'ensemble de cette chaîne réactionnelle donne l'équation globale de la phase photochimique acyclique (équation (2)).



L'équation (2) montre que quatre photons sont nécessaires pour former un ATP et un NADPH.

La chaîne photochimique non cyclique est donc totalement dépendante des deux impacts lumineux sur les PS II et PS I qui abaissent leur potentiel d'oxydoréduction permettant ainsi le trajet spontané d'électron exergonique (générateur d'énergie).

L'énergie va se trouver sous forme de coenzyme réduite de type NADPH, H⁺ en fin de chaîne mais aussi sous forme d'ATP (figure 7).

La formation d'ATP (ou phosphorylation) peut aussi fonctionner de manière cyclique. Au niveau du PS I, les électrons émis par la chlorophylle reviennent réalimenter le complexe b6/f (shunt d'électron). Lorsqu'il y a une quantité suffisante de NADPH, leur production est bloquée, les électrons se recyclent pour produire plus d'énergie sans produire de NADPH.

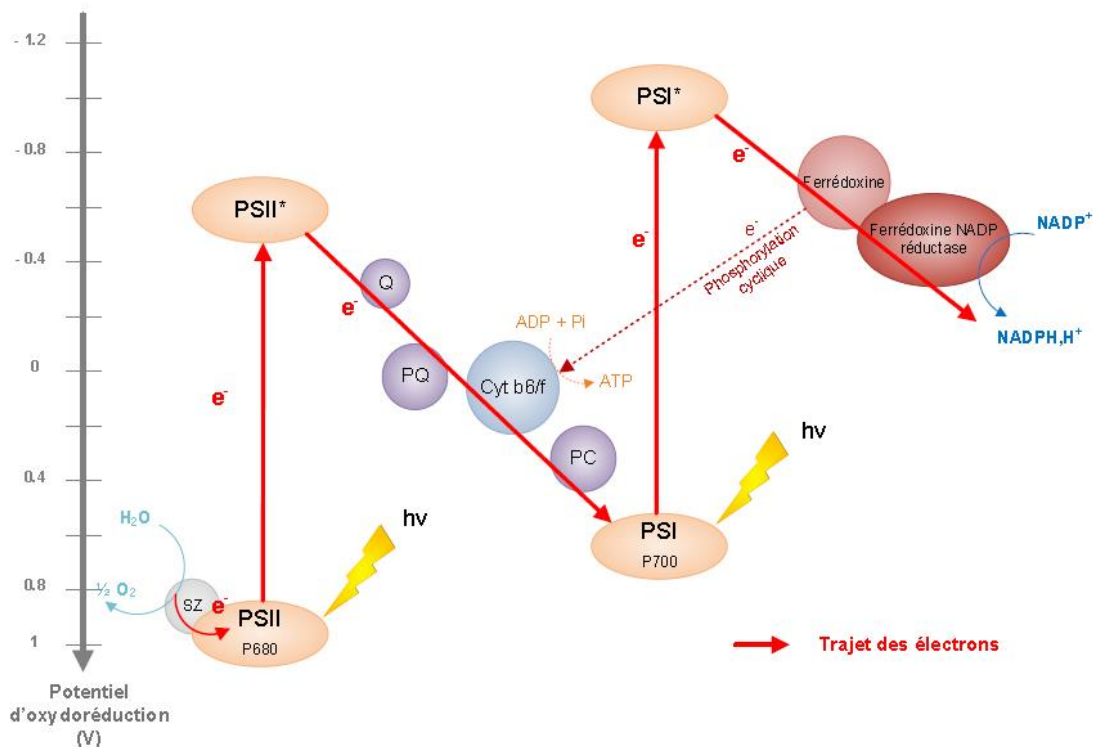


Figure 7 : Schéma Z de la photosynthèse (Hu, 2004)

I.1.6.2. Phase d'assimilation de CO_2 ou phase obscure (non dépendante de la lumière)

Cette phase se déroule dans le stroma et ne nécessite pas directement de la lumière. Cette phase va réduire le CO_2 en matières organiques (glucides, lipides et protéines) (Zeng et *al.*, 2011). L'ATP et le NADPH, H^+ formés lors de la phase photochimique sont nécessaires pour la fixation du carbone. Le CO_2 va interagir avec le ribulose 1-5, diphosphate dans une réaction catalysée par l'enzyme nommée RubisCo. Cette enzyme est donc responsable de la fixation catalytique du CO_2 dans la cellule (Langley et *al.*, 2012). La fixation de carbone est dépendante des produits créés pendant la phase éclairée mais ne dépend pas directement de l'énergie lumineuse. Par contre cette phase a besoin d'un apport continu en ribulose 1-5, diphosphate. Cette molécule est régénérée lors du cycle de Calvin (figure 8). Le cycle de Calvin est composé de trois phases : la phase de carboxylation (intégration du CO_2), la phase de réduction, la phase de régénération (Hu, 2004).

Pour une molécule de CO_2 fixée, trois molécules d'ATP et deux molécules de NADPH, H^+ sont consommées.

Dans des conditions optimales, 10 à 16 moles de photons sont nécessaires pour fixer une mole de CO_2 (Richmond, 2004). En théorie huit moles de CO_2 sont nécessaires. Les moles en plus correspondent aux besoins minimums de la cellule en énergie. (Cadoret and Bernard, 2008).

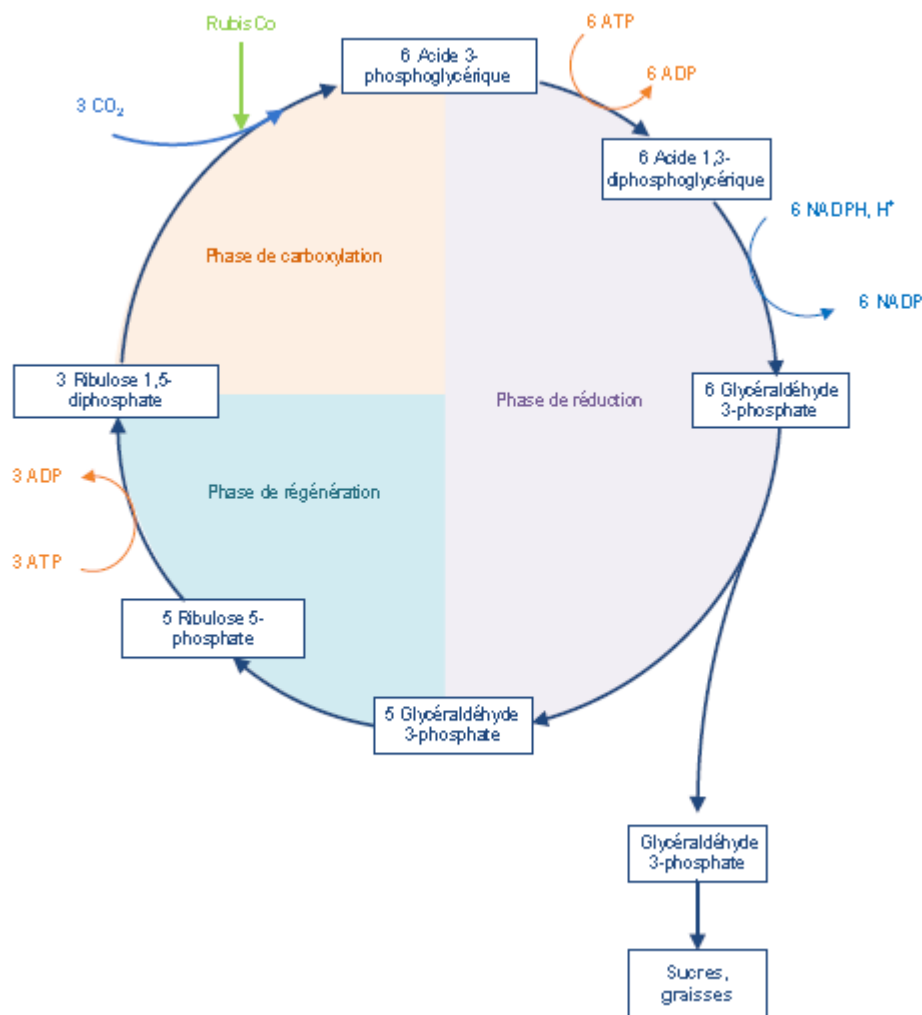


Figure 8 : Cycle de Calvin (Cadoret and Bernard, 2008)

I.1.7. La respiration cellulaire

Quand il n'y a plus de source lumineuse, la microalgue continue de produire de l'ATP et du NADPH par respiration cellulaire ou respiration mitochondriale. La respiration cellulaire a lieu dans les mitochondries, son fonctionnement est basé sur le même principe que la photosynthèse, c'est-à-dire le transfert d'électron d'un complexe membranaire à un autre (figure 9).

Quatre complexes multienzymatiques localisés dans la membrane interne des mitochondries forment la chaîne respiratoire. Ces complexes vont transporter les électrons jusqu'à la transformation d'oxygène en eau. Les complexes sont aussi des pompes à protons, ils s'accumulent dans l'espace inter membranaire, créant un gradient de protons. Ce gradient de protons permet la synthèse d'ATP par l'ATP synthétase.

La respiration cellulaire permet la consommation d'oxygène et la formation d'ATP, mais elle ne produit pas de NADPH, essentielle pour la fixation de dioxyde de carbone. Lors de la production de microalgues, 25% de la biomasse produite pendant la journée est perdue durant la nuit à cause de la respiration cellulaire, cette perte peut être réduite par un abaissement de la température (Chisti, 2007).

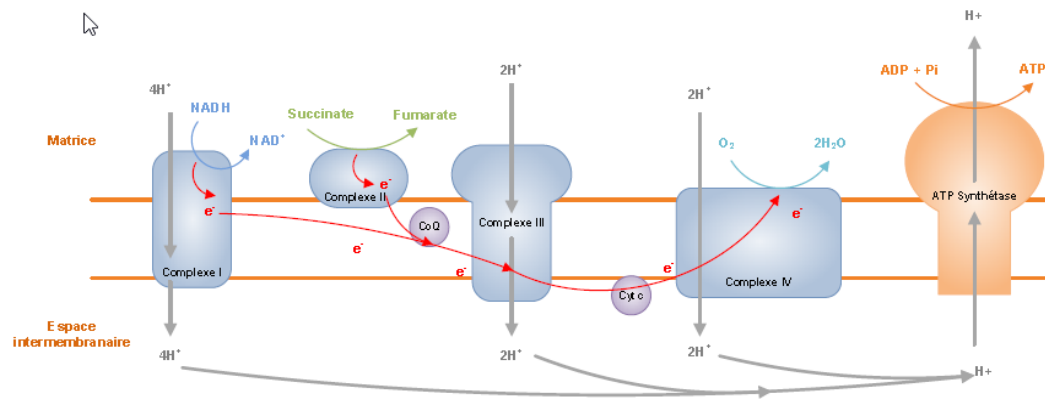


Figure 9 : La chaîne respiratoire (Chisti, 2007)

I.1.7.1. Photorespiration

La photorespiration est un processus compétitif avec la première phase du cycle de Calvin. L'enzyme catalysant la réaction d'intégration du CO_2 peut agir comme une oxygénase pour catalyser la réaction de l'oxygène avec la ribulose phosphate. L'enzyme RubisCo a plus d'affinité avec l'oxygène qu'avec le dioxyde de carbone, c'est pour cela qu'une concentration élevée en oxygène inhibe la photosynthèse. La photorespiration diminue de 20 à 30% l'efficacité de la photosynthèse (Zeng et al., 2011). Pour éviter ce phénomène, l'air pour les cultures de microalgues est enrichi en CO_2 .

I.1.8. Molécules d'intérêts produites par les microalgues

L'intérêt majeur de la culture de microalgues est la production de molécules à hautes valeurs ajoutées. Les microalgues sont une source importante de lipides, de protéines, de polysaccharides et de pigments.

I.1.8.1. Les lipides

Les lipides sont des constituants indispensables des cellules de microalgues. On les retrouve au niveau structural (phospholipides constitutifs des membranes) et énergétique (molécules de réserve). Globalement, les microalgues peuvent être composées de lipides à hauteur de

16 à 75% de leur masse sèche en fonction des espèces (Harun et *al.*, 2010). Les microalgues stockent les lipides sous forme de triacylglycérols (ou triglycérides). Les triacylglycérols sont composés de trois molécules d'acide gras et d'un glycérol. Les microalgues contiennent une grande variété d'acides gras, dont la composition varie en fonction des espèces. Ainsi il existe des microalgues oléagineuses ayant de fortes teneurs en lipides telles que *Pseudochlorococcum sp.* (*Chlorophyceae*) (Li et *al.*, 2011) ou *Nannochloropsis oceanica* (*Eustigmaphyceae*) (Wan et *al.*, 2013) qui peuvent accumuler des lipides à hauteur de respectivement 52% et 65%.

Les microalgues produisent des acides gras spécifiques qui peuvent trouver différentes utilisations (agroalimentaire, pharmaceutique, bioraffinerie, etc.). Les lipides sont principalement utilisés pour la fabrication de biocarburants. Les microalgues produisent des lipides neutres faiblement insaturés qui sont donc propices à la formation de biodiesel (Harun et *al.*, 2010). Dans le cas de *Nannochloropsis oceanica*, les principaux acides gras identifiés ont été l'acide hexadécadiénoïque (C16 :2), l'acide palmitique (C16 :0) et l'acide oléique (C18 :1) avec 65% de lipides saturés et 26-33% de mono-insaturés. Même si toutes les microalgues produisent majoritairement des triacylglycérols qui contiennent des acides gras en C16 et C18, il est possible de trouver des compositions variables en fonction des espèces et des conditions de culture. Ainsi, les microalgues vertes de l'espèce *Chlorella vulgaris* accumulent des C18 :1, C18 :2 (acide linoléique), et des C18 :3 (acide linoléique) (Pignolet et *al.*, 2013) tandis que les C16 :0, C18 :1 et C18 :2 sont les principaux acides gras produits par les microalgues appartenant au genre *Scenedesmus* (Vidyashankar et *al.*, 2013).

Les microalgues sont aussi des producteurs d'oméga-3 qui peuvent être extraits et utilisés comme complément alimentaire pour l'Homme. Les microalgues synthétisent également des acides arachidonique et eicosapentaénoïque (EPA) et linoléique. L'EPA et l'acide arachidonique peuvent moduler le métabolisme humain. L'acide arachidonique est un composant des membranes phospholipidiques et est précurseur des prostaglandines, alors que l'EPA est précurseur des eicosanoïdes (Rebeloso Fuentes et *al.*, 2000). D'autre part, les acides gras insaturés de certaines microalgues comme ceux produits par les microalgues du genre *Nitzschia* limitent la formation de molécules pathogéniques (produit final de glycation avancée) responsable de complications dans le diabète. La consommation de ces microalgues est bénéfique pour les rats diabétiques (Sun et *al.*, 2010).

L'environnement et les conditions de cultures impactent la composition et la teneur en lipides des microalgues. Chez *Scenedesmus*, les triacylglycérols diminuent avec la température. A des températures moyennes (20-25°C) le degré d'insaturation des acides gras est plus faible et les acides gras sont à chaînes longues (C22 : acide docosanoïque), acides gras qui sont absents pour les autres températures (10-30°C). A 10°C les lipides contiennent une majorité de C18 :3 (linoléique) (+ de 80%), à 30°C ils possèdent 50% de C18 :1, (n-9) (acide oléique). Les C18 :2, (n-7) (acide linoléique) sont présents à toutes les températures (10°C, 20°C, 25°C et 30°C). Chez les espèces appartenant aux genres *Chlorella* et *Scenedesmus* les températures supérieures à la température optimale de croissance permettent une augmentation des C16 et une diminution des C18 (Xin et *al.*, 2011 ; Han et *al.*, 2013).

a) Production de lipides

En comparaison avec les plantes supérieures, le métabolisme des lipides, et en particulier les voies de biosynthèse des acides gras et des triglycérides, ont été peu étudiées chez les microalgues (Hu et *al.*, 2008). Mais, en se basant sur l'homologie des séquences des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique isolés des algues et des plantes supérieures, il est en général admis que les voies de base de la biosynthèse des acides gras et des triglycérides

chez les microalgues sont très proches de celles mises en évidence chez les plantes supérieures.

b) Localisation de la production des lipides

Comme chez les végétaux terrestres, certaines espèces de micro-algues peuvent accumuler, dans certaines conditions de culture, le carbone fixé, sous forme de lipides appelés triglycérides. Les lipides stockés constituent alors une réserve de carbone pour la micro-algue. En conditions normales, ces teneurs restent faibles, comprises entre 20 et 50%, et les lipides sont principalement constitués de phospholipides et de glycolipides (constituants des membranes). Cependant certaines espèces sont capables d'accumuler jusqu'à 80% de leur poids sec en lipides (Bigogno et *al.*, 2002 ; Chisti, 2007). Ainsi, les familles d'algues suivantes sont les plus productrices de lipides : Chlorophycées (ex : *Chlorella vulgaris*), Chrysophycées (ex : *Diatomées*) et Bacillariophycées (ex : *Chaetoceros calcitrans*).

Le stockage de lipides résulte d'un déséquilibre transitoire entre le flux de carbone issu de la photosynthèse et le flux d'autres éléments nécessaires à la croissance (phosphore ou azote). La cellule, qui est carencée en l'un de ces éléments, n'interrompt pas immédiatement l'acquisition du CO_2 nécessaire à la photosynthèse, alors qu'elle ne peut pas l'utiliser pour construire des protéines puisque, par exemple, l'azote est manquant. Elle doit donc stocker ce flux, et chez certaines espèces, ce stockage a lieu principalement sous forme de lipides.

Ainsi, on observe chez ces espèces de micro-algues des organites particuliers : les oléoplastes.

Les oléoplastes sont des organites spécifiques des cellules végétales spécialisés dans le stockage des lipides, essentiellement sous forme de plastoglobules (gouttelettes lipidiques sphériques de triglycérides synthétisés à partir d'acides gras venant des chloroplastes). Ce sont des plastes sans pigments, et plus spécifiquement des leucoplastes. Ils sont souvent associés aux membranes des thylakoïdes.

c) Mécanisme de la lipogenèse et lipides produits

La biosynthèse des acides gras et des lipides répond à deux impératifs dans la cellule :

- Fourniture des acides gras nécessaires à la synthèse des lipides de structure ;
- Mise en réserve de l'énergie.

La biosynthèse des acides gras se fait dans le cytosol alors que leur dégradation par β -oxydation se fait à l'intérieur des mitochondries. Toute biosynthèse comme la synthèse des lipides nécessite :

- De l'énergie apportée par l'ATP ;
- Du pouvoir réducteur, fourni sous forme de NADPH, H^+ provenant essentiellement du fonctionnement de la voie des pentoses phosphates ;
- Des précurseurs, le seul précurseur de la synthèse des acides gras est l'acétyl-CoA.

L'acétyl-CoA provient de :

- La β -oxydation des acides gras (intramitochondriale) ;
- L'oxydation du pyruvate (mitochondriale) ;
- La dégradation oxydative des acides aminés dits cétogènes.

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

d) Les types de lipides produits

Les lipides constituent un groupe très hétérogène de composés. Cette hétérogénéité n'est pas seulement basée sur la structure, mais plutôt sur la polarité des différents composés. Donc, en se basant sur la polarité des lipides, on peut les classer en deux groupes : lipides polaires et lipides neutres (non polaires) (Huang *et al.*, 2010). En général, les lipides polaires sont essentiellement constitués des glycolipides et des phospholipides qui sont des constituants structuraux et fonctionnels des membranes cellulaires (paroi de la cellule entière) et des membranes des organelles intracellulaires (ex, chloroplaste et mitochondries). Les lipides neutres, ou autrement dit les lipides non polaires, ne renferment aucune partie hydrophile. Ils sont majoritairement constitués des triglycérides, qui sont des lipides intracellulaires. Contrairement aux lipides polaires, les triglycérides ne remplissent pas un rôle structural mais servent principalement pour le stockage d'énergie et de carbone par la cellule.

e) Facteurs permettant d'augmenter la synthèse lipidique

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

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

Les teneurs en lipides (qui seront alors principalement constituées de triglycérides) sont considérablement accrues et peuvent atteindre 80% de la matière sèche (Metting, 1996). Ces conditions de fortes productivités ne peuvent toutefois pas être maintenues pendant de longues durées : elles conduisent le plus souvent à un arrêt de la croissance, puis, après un laps de temps, à la remobilisation des réserves lipidiques ainsi produites.

I.1.8.2. Les protéines

Les microalgues produisent une quantité non négligeable de protéines à hauteur de 6 à 71% de leur masse sèche en fonction des espèces (Becker, 2007). A titre d'exemple, *Chlorella vulgaris* accumule jusqu'à 46% de protéines et *Arthrospira platensis* 70% (Pignolet *et al.*, 2013). Les protéines issues des microalgues constituent donc une fraction importante de la biomasse et sont une source importante d'acides aminés dont des acides aminés essentiels (Pignolet *et al.*, 2013). Les protéines produites par *Arthrospira platensis* sont à plus de 90% digestibles et contiennent 60% d'acides aminés essentiels (Dillon and Phan, 1993). Chez *Scenedesmus obliquus*, 30 à 45% des acides aminés totaux sont des acides aminés essentiels (Becker, 2007).

La production de protéines par les microalgues diminue logiquement lors de carences en Azote et est maximale lorsque les microalgues sont en phase exponentielle de croissance (Ho *et al.*, 2013 ; Wang *et al.*, 2013). La part de protéines est généralement sous-évaluée par rapport aux produits secondaires tels que les acides gras insaturés ou les pigments, pour des applications médicales, pharmaceutiques et nutraceutiques. Aujourd'hui, il n'existe toujours

pas de demandes importantes d'extraits de protéines de microalgues purifiées car la présence de composants non protéiques conduit généralement à des changements indésirables dans la couleur ou le goût des protéines. Néanmoins, les efforts se tournent maintenant vers le potentiel génétique impressionnant des microalgues d'une part, et les activités spécifiques des protéines de microalgues d'autre part. Certaines biomasses algales sont cependant déjà utilisées comme compléments dans l'alimentation humaine et animale (aquaculture) en raison de leur haute teneur en protéines (Harun *et al.*, 2010).

I.1.8.3. Les pigments et les antioxydants

Les microalgues produisent des pigments indispensables à la photosynthèse. Elles possèdent toutes de la chlorophylle et des caroténoïdes (figure 10) en quantités variables, certaines produisent même des phycobilines. Les pigments sont des molécules complexes, qui ont la capacité de changer la couleur de la lumière réfléchiée ou transmise en fonction de l'absorption de longueurs d'onde spécifiques. Les microalgues bleues et rouges contiennent des phycobilines comme la phycoérythrine et la phycocyanine qui sont liées de façon covalente à des protéines spécifiques pour former les phycobiliprotéines constitutives du phycobilisome. Les caroténoïdes peuvent être violets, jaunes ou rouges. Ce sont des molécules liposolubles dont la structure de base est un enchaînement de huit unités isopréniques (2-méthyl 1,3-butadiène) possédant de nombreuses doubles liaisons conjuguées responsables de leur coloration. La majorité des caroténoïdes possèdent des cycles à l'une ou aux deux extrémités.

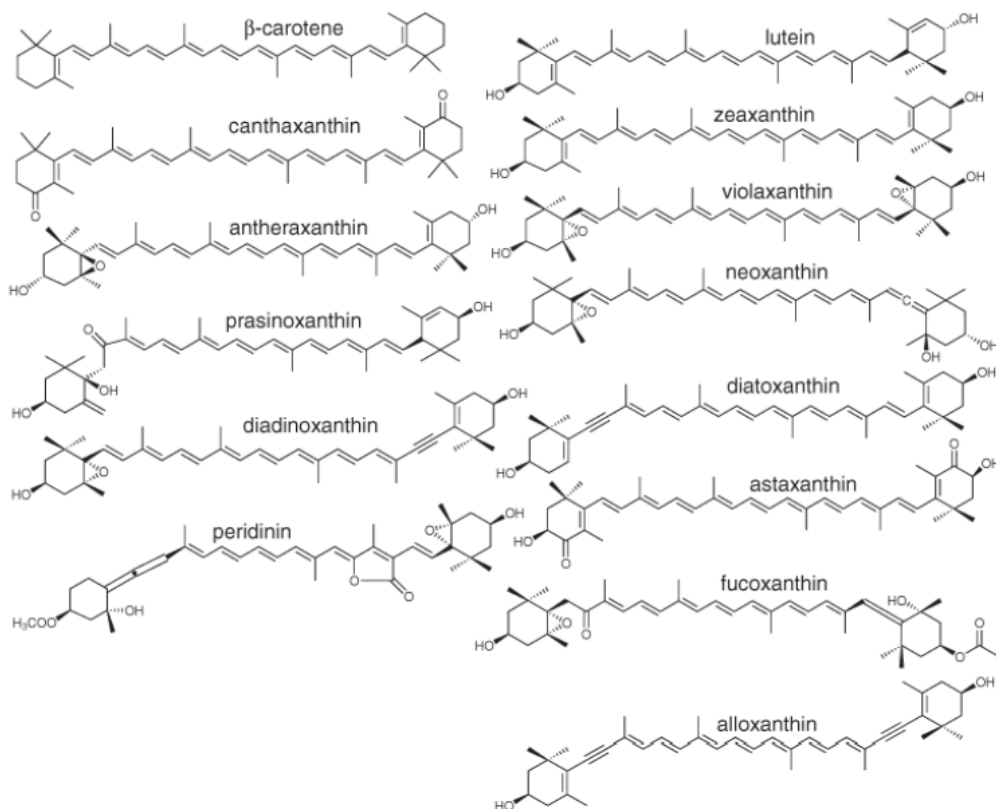


Figure 10 : Structure des principaux caroténoïdes de microalgues (Guarati *et al.*, 2009)

L'accumulation de caroténoïdes secondaires est généralement considérée comme une stratégie de survie employée par les algues en situation de stress photo-oxydatif ou d'autres conditions environnementales défavorables (Hu *et al.*, 2008). Les plus importants sont le bêta-carotène et la lutéine jaune de couleur rouge-orange. Les xanthophylles et phycobilines

sont des composés de grande valeur pour les applications industrielles. Les microalgues eucaryotes *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis* sont des organismes producteurs de pigments (Pignolet et al., 2013). Les microalgues acidophiles de l'espèce *Chlamydomonas acidophila* accumulent aussi des caroténoïdes de type bêta-carotène, lutéine, zéaxanthine et violaxanthine (Cuaresma et al., 2006).

Les pigments tels que les caroténoïdes (orange-rose) et les phycoérythrine (rouge) sont utilisés comme colorants en cosmétique et en industries agro-alimentaires (Rebeloso Fuentes et al., 2000). Ils peuvent également être utilisés pour leur fluorescence, dans les immunotests diagnostiques (Mihova et al., 1966). Les pigments ont aussi des activités biologiques. Par exemple la chlorophylle, qui est un agent chélatant, peut être utilisée comme traitement dans les ulcères pour la régénération des tissus du foie (Harun et al., 2010).

Les microalgues sont exposées à des stress oxydatifs et doivent donc produire des antioxydants. L'assimilation de l'oxygène par les organismes peut entraîner la formation de dérivés dangereux parmi lesquels l'oxygène singulet et les radicaux libres qui provoquent des dommages cellulaires. Ces formes très réactives ont un rôle important dans diverses pathologies chroniques (cancer, athérosclérose, arthrose, Parkinson...) ou aiguës (inflammation, choc septique...) (Klein et al., 2012). Les antioxydants sont des composés capables de réduire les radicaux libres et de prévenir l'oxydation de molécules sensibles à l'oxydation tels que les lipides ou les acides aminés. Le coenzyme Q10, l'alpha-tocophérol, l'ubiquinone ou la plastoquinone sont des molécules présentes chez les microalgues et ayant un pouvoir antioxydant (Mallick and Mohn, 2000).

Les superoxydesdismutases (SOD), qui sont des enzymes anti-radicalaires, sont également abondantes chez certaines microalgues telles que les porphyridiales. Ces enzymes présentent un double intérêt comme traitement dans les pathologies accompagnées d'une forte augmentation de radicaux libres (notion de thérapies antioxydantes) et en cosmétique dans l'élaboration de soins anti-âge (Mallick and Mohn, 2000).

I.1.8.4. Les glucides

Les saccharides ou glucides sont les macronutriments les plus répandus dans la matière vivante et la majeure partie d'entre eux est produite lors de la photosynthèse. Ils représentent 5% de la masse sèche des animaux et jusqu'à 70% de celle des végétaux. Les glucides sont composés de carbone, d'hydrogène et d'oxygène selon la formule $C_n(H_2O)_n$. Les glucides simples ou monosaccharides sont l'unité de base des saccharides. Ils sont porteurs d'au moins trois carbones (trioses), de deux fonctions alcools (OH), d'une fonction carbonyle (fonction aldéhyde (-CHO) ou cétone (-C=O), et parfois d'une fonction amine (-NH₂) ou carboxylique (-COOH). Les monosaccharides peuvent être reliés entre eux par des liaisons O-glycosidiques et le nombre d'unités constitutives permet de déterminer le degré de polymérisation de ces polymères afin de les classer en deux catégories : les oligosaccharides composés de 2 à 10 monosaccharides et les polysaccharides constitués de plus de 10 monosaccharides. Les saccharides sont soit des holosides composés uniquement d'oses, soit des hétérosides composés d'oses et d'une partie non osidique dite aglycone. Les différents types de monosaccharides et de liaisons formées entre les unités principales permettent une grande variation de structure. La liaison osidique qui résulte d'une réaction de condensation entre deux oses, peut se faire entre l'hydroxyle porté par le carbone anomérique d'un ose et n'importe lequel des groupements hydroxyyles d'un autre monosaccharide entraînant la formation d'une large gamme de macromolécules linéaires ou ramifiées. Tous ces paramètres participent à la diversité des polysaccharides qui peut encore être augmentée par la substitution des hydroxyyles par des groupements non sucres de faibles tailles.

Les polysaccharides sont des molécules de haute masse molaire pouvant atteindre plusieurs millions de $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Les saccharides peuvent avoir plusieurs fonctions cellulaires. Ils peuvent jouer le rôle de molécules de réserve pour le stockage de l'énergie (amidon et glycogène) par les cellules. Ils peuvent faire partie intégrante d'autres familles moléculaires et avoir un rôle important dans le stockage de l'information et la communication cellulaire. C'est le cas des acides nucléiques (polyriboses et polydesoxyriboses), des glycosylations de protéines (glycoprotéines) ou de lipides (lipopolysaccharides), des glycosaminoglycanes (héparine, acide chondroïtique, hyaluronane...). Ils peuvent également avoir un rôle dans le maintien et la résistance des tissus ou des cellules. Dans ce dernier cas, on peut citer certains mucopolysaccharides, la cellulose, la chitine ou encore le peptidoglycane.

I.2. Culture des microalgues

I.2.1. L'impact des paramètres de culture sur la croissance des microalgues

La culture de microalgues est soumise à l'influence de plusieurs paramètres environnementaux physiques ou biologiques qui sont dépendants des 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 dans la culture (Richmond, 2004). Ce sont la lumière, la température, le pH, la salinité, les éléments nutritifs, la concentration de l'oxygène dissous et la présence d'éléments toxiques (Kumar et *al.*, 2010).

D'autres paramètres liés au fonctionnement hydrodynamique du réacteur, tels que le temps de séjour, la vitesse du transfert gazeux et le degré d'homogénéité du milieu, peuvent jouer sur la disponibilité des nutriments et de l'énergie lumineuse (Kumar et *al.*, 2010).

I.2.1.1. Le carbone

Les microalgues peuvent assimiler une grande variété de formes de carbone inorganique ou organique selon les espèces. Le glucose, l'acétate, le glycérol, le fructose, le sucrose, le lactose, le galactose et le mannose sont des exemples de formes de carbone organique qui peuvent être assimilées par certaines microalgues (Chen et *al.*, 2011). À l'inverse, c'est le CO_2 (ou le HCO_3^-) qui est la source de carbone inorganique utilisée. Selon les conditions dans lesquelles elles se trouvent, les microalgues peuvent modifier le type de carbone qu'elles utilisent et le moyen dont elles acquièrent leur énergie.

La croissance cellulaire est stimulée par l'augmentation de la concentration de CO_2 (concentration optimale). Pour une concentration de CO_2 supérieure à la concentration optimale définie lors des études, l'effet est négatif.

De par la complexité des relations entre CO_2 , l'environnement et la cellule il est essentiel de prendre en compte l'ensemble des paramètres environnementaux dans l'étude de l'effet de CO_2 sur les cultures de microalgues en photobioréacteur. £££££

I.2.1.2. Le substrat azoté

Pour le développement des microalgues, l'azote est indispensable. En effet, c'est un élément constitutif des acides aminés qui composent les protéines et il représente entre 1 et 10% de la biomasse sèche. Dans des cultures en auto- et hétérotrophie les sources d'azote sont principalement minérales (NH_4^+ , NO_3^- et NO_2^-) mais il existe également des sources organiques telles que l'urée et les acides aminés. Lors de l'assimilation des nitrates il y a augmentation du pH. Cette assimilation est très énergétivore pour la cellule et nécessite une consommation importante de protons. Les nitrates sont transportés dans les cellules puis ils

sont réduits en nitrite par une nitrate réductase. Cette réaction utilise 2 électrons. Il existe un lien entre le métabolisme de l'azote et celui du carbone. En effet, les glucides sont des activateurs de la transcription des nitrates réductases.

Les nitrites sont réduits dans la cellule en ammonium par une nitrite réductase. Cette réaction nécessite 6 électrons et 8 protons ce qui conduit à l'augmentation du pH de la cellule.

L'ammonium est associé à du cétooglutarate pour former du glutamate via l'activité de la glutamate déshydrogénase (enzyme présente dans les mitochondries et les chloroplastes). Il peut également être associé au glutamate pour générer de la glutamine après action de la glutamine synthétase. La glutamine et le glutamate peuvent ensuite être utilisés pour la biosynthèse d'acides aminés (transamination) et donc de structures protéiques.

La nature de la source d'azote influence la production et le métabolisme des microalgues. L'ammonium (NH_4^+) et les acides aminés tel que la L-arginine sont les sources d'azote les plus assimilables par les microorganismes. La L-glutamine, les nitrates (NO_3^-) et les nitrites (NO_2^-) sont aussi des sources d'azote utilisables par la plupart des microalgues, contrairement à l'urée et à d'autres formes d'azote organique de nature non acide aminé (Perez-Garcia et al., 2011).

Comme indiqué précédemment, les métabolismes de l'azote et du carbone sont fortement liés.

En présence d'azote, le flux de carbone (issu de la fixation du CO_2) est dirigé vers la glycolyse (au détriment de la synthèse de saccharose, d'amidon ou de lipides) pour permettre la production de précurseurs d'acides aminés (Morot-Gaudry, 1997). Par conséquent, lorsque le milieu de culture des microalgues est carencé en azote, la croissance des microalgues diminue. Elles entrent en phase stationnaire et accumulent des lipides (triacylglycérols) et/ou des glucides, au détriment des protéines et des pigments (Ho et al., 2012) Ce phénomène induit un accroissement du volume cellulaire (Lamers et al., 2012).

I.2.1.3. Le phosphore

Le phosphore est un atome indispensable à la vie des organismes. Il participe à de nombreux processus métaboliques, notamment au travers des échanges d'énergie (ATP), dans la formation des acides nucléiques et des phospholipides (Prescott et al., 2003). Le phosphore est peu répandu dans la nature. Le phosphore est assimilable par les cellules lorsqu'il est sous forme de phosphate inorganique ou dans les molécules organiques solubles. Dans le dernier cas, les molécules peuvent être rendues assimilables par les espèces autotrophes qui utilisent des phosphatases pour hydrolyser les groupes phosphates. L'assimilation du phosphore est régulée par un processus ionique et chimique (Falkowski and Raven, 2007). Il entre dans la cellule par un transport actif à travers la membrane cellulaire qui est activé directement ou indirectement par l'ATP (Raven, 1984).

I.2.1.4. Les microéléments

Les microéléments sont des éléments présents dans le milieu en très faible quantité. Dans le milieu naturel leur concentration va varier en fonction des époques de l'année, des conditions environnementales ou bien des pollutions anthropogéniques. En laboratoire, leurs limitations sont rarement rencontrées car les milieux de culture sont adaptés pour éviter tout manque de ces éléments. Les changements de concentration vont avoir des répercussions sur la cellule de microalgue.

Chez *Isochrysis galbana* une carence en fer va se traduire par une baisse de la densité cellulaire, de la taille des cellules, de la quantité de chlorophylle, de protéines et de polysaccharides intracellulaires, une baisse de l'activité de l'anhydrase carbonique et une

diminution de l'incorporation des autres nutriments (azote, phosphore, carbone) (Valera et al., 2011). L'anhydrase carbonique étant une métalloenzyme contenant du zinc, une baisse de son activité en réponse à une carence en zinc peut se répercuter sur tout le métabolisme du carbone de la cellule et donc sur la production des métabolites intracellulaires. Les limitations en microéléments visent souvent le fonctionnement de l'appareil photosynthétique. Par exemple une trop faible concentration en sulfure va diminuer le flux d'électrons au niveau de l'appareil photosynthétique (Rochaix, 2001) et une baisse de la concentration de fer va induire une baisse des constituants de l'appareil photosynthétique (PSI, PSII, cytochromes) car ceux-ci possèdent de nombreux co-facteurs contenant du fer (Terauchi et al., 2010). De même, le cuivre étant présent dans de nombreuses enzymes de l'appareil photosynthétique, sa limitation impacte le métabolisme de photosynthèse (Rochaix, 2001). Mais d'autres processus intracellulaires peuvent être concernés ; c'est le cas du métabolisme de l'azote dont l'assimilation dans la cellule est diminuée lors d'une carence en molybdène dans le milieu (Glass et al., 2009).

Une augmentation de ces éléments dans le milieu va à l'inverse avoir un impact positif sur les cellules. C'est le cas du magnésium ou du fer qui permettent l'augmentation de la concentration cellulaire lorsqu'ils sont en plus forte concentration (Dragore, 2011). Seulement cet effet positif a lieu jusqu'à une certaine concentration, à partir de laquelle ces composés deviennent toxiques pour la cellule. Ainsi le fer en trop forte quantité dans la cellule, va endommager les membranes biologiques, les protéines ou bien encore l'ADN (Estevez, 2001). De même le zinc à des concentrations trop importantes bloque la croissance des algues (Varela et al., 2011). Face à ces variations de concentration dans le milieu, les algues offrent un large panel d'adaptations physiologiques qui leur permettent de survivre. Chez *Chlorella vulgaris* par exemple, il existe une hormone, la brassinolide, qui aide la cellule à contrer les effets cytotoxiques de fortes concentrations de métaux lourds (cuivre, plomb, cadmium) (Bajguz, 2010). Pour le cuivre, il existe des mécanismes qui permettent de réguler son assimilation lorsque sa concentration dans le milieu est trop faible pour l'algue. Ces mécanismes se traduisent, entre autres, par l'expression spécifique de certains gènes (La Fontaine et al., 2002). De même, l'appareil photosynthétique de la cellule peut lui aussi présenter des modifications afin de s'adapter à une carence du milieu. C'est le cas pour des limitations en fer, où par exemple, les antennes collectrices de photons vont être réorganisées de façon à s'adapter aux modifications physiologiques de la cellule carencée et de limiter les phénomènes de dommage cellulaire liés à la lumière, tout en optimisant l'activité photosynthétique (Michel and Pistorius, 2004). Seulement cet effet positif a lieu jusqu'à une certaine concentration, à partir de laquelle ces composés deviennent toxiques pour la cellule. Ainsi le fer en trop forte quantité dans la cellule, va endommager les membranes biologiques, les protéines ou bien encore l'ADN (Estevez, 2001). De même le zinc à des concentrations trop importantes bloque la croissance des algues (Varela et al., 2011).

Face à ces variations de concentration dans le milieu, les algues offrent un large panel d'adaptations physiologiques qui leur permettent de survivre. Chez *Chlorellavulgaris* par exemple, il existe une hormone, la brassinolide, qui aide la cellule à contrer les effets cytotoxiques de fortes concentrations de métaux lourds (cuivre, plomb, cadmium) (Bajguz, 2010). Pour le cuivre, il existe des mécanismes qui permettent de réguler son assimilation lorsque sa concentration dans le milieu est trop faible pour l'algue. Ces mécanismes se traduisent, entre autres, par l'expression spécifique de certains gènes (La Fontaine et al., 2002). De même, l'appareil photosynthétique de la cellule peut lui aussi présenter des modifications afin de s'adapter à une carence du milieu. C'est le cas pour des limitations en fer, où par exemple, les antennes collectrices de photons vont être réorganisées de façon à



s'adapter aux modifications physiologiques de la cellule carencée et de limiter les phénomènes de dommage cellulaire liés à la lumière, tout en optimisant l'activité photosynthétique (Moseley *et al.*, 2002 ; Michel and Pistorius, 2004).

I.2.1.5. La lumière

La lumière est un des facteurs indispensables au métabolisme photosynthétique des microalgues. L'apport de l'énergie lumineuse peut se produire de manière naturelle grâce à l'énergie solaire ou bien artificiellement grâce à des tubes fluorescents émettant de la lumière à une longueur d'onde bien spécifique. En dehors de toute limitation minérale, la lumière reste le principal facteur limitant pour la culture des microalgues. Au sein d'une culture, ce substrat n'est jamais homogène du fait de l'absorption de lumière par les cellules.

On rencontre plusieurs types de comportement des microalgues selon le degré d'illumination (figure 11) :

- **Phase de respiration (en absence de lumière) :** réactions métaboliques de consommation de l'oxygène et de rejet de dioxyde de carbone ;
- **Phase de limitation :** liée à un apport insuffisant d'énergie lumineuse (faible intensité lumineuse, trajet lumineux élevé, géométrie non favorable du réacteur) ou au phénomène d'ombrage cellulaire mutuel induit par une forte concentration cellulaire (Kumar *et al.*, 2011) ;
- **Phase de saturation :** traduite par un rendement photosynthétique maximal ;
- **Phase d'inhibition :** définie par une perte de l'activité photosynthétique en raison d'une trop forte intensité lumineuse (Vonshak *et al.*, 1988).

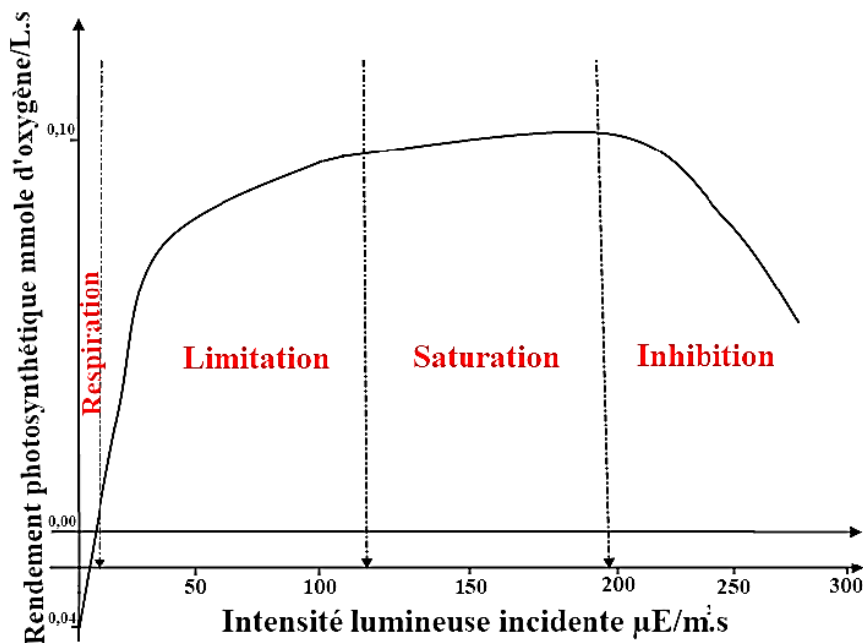


Figure 11 : Rendement photosynthétique en fonction de l'intensité lumineuse incidente (exprimée en $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) (Goldman, 1980)

Une limitation ou un excès de lumière vont donc avoir des répercussions sur le métabolisme des cellules et la croissance des populations. Ce phénomène s'appelle la photoinhibition. Lorsque la cellule reçoit plus d'énergie lumineuse qu'elle ne peut en intégrer vers la synthèse d'ATP et l'assimilation du carbone, la photosynthèse est inhibée (figure 11) et la croissance

cellulaire chute (Yeh *et al.*, 2010). Lors de la photoinhibition, le photosystème II (PSII) trop excité par l'excès de lumière va être inactivé et il se forme alors une accumulation d'électrons entre les deux photosystèmes (PSII et PSI) qui peut conduire à des altérations irréversibles au sein de la cellule (Voronova *et al.*, 2008). Pour contrer ces phénomènes de photoinhibition, la cellule met en place des processus de photoprotection qui vont soulager le PSII et permettre ainsi à l'appareil photosynthétique de retrouver son fonctionnement optimal. Le premier mécanisme de protection est l'élimination de l'énergie en excès sous forme de chaleur en faisant intervenir des pigments particuliers, les caroténoïdes (Peers *et al.*, 2009). L'inactivation du PSII peut aussi dans certain cas être un processus de photoprotection. L'un des résultats de la photoprotection sera la photoacclimatation de la cellule. Celle-ci va accroître son activité photosynthétique via l'augmentation de l'activité de la Rubisco et de l'ATPase (Chow, 1994). Ainsi des cellules d'algue transposées d'un environnement faiblement éclairé à un environnement fortement éclairé vont diminuer leur quantité intracellulaire de chlorophylles et augmenter celle de caroténoïdes, modifier la taille du pool de composés transporteurs d'électrons (Solovchenko *et al.*, 2010). Dans certain cas il peut y avoir synthèse d'autres composés intracellulaires, comme chez *Haematococcus pluvialis* où un stress lumineux va se traduire par la production d'astaxanthine, un pigment très recherché dans l'industrie alimentaire (Kang *et al.*, 2007). Tous ces réarrangements permettent à la cellule d'augmenter son rendement de photosynthèse c'est-à-dire sa production d' O_2 , ce qui entraîne la mobilisation de l'énergie en excès captée et donc évite des dégradations cellulaires.

I.2.1.6. La température

La température est un facteur qui intervient dans le développement et la croissance cellulaire des microalgues. Les microalgues n'ont pas toutes le même comportement vis-à-vis de la température. Elles peuvent être cryophiles, mésophiles ou encore thermotolérantes. Les microalgues cryophiles se développent à des températures de l'ordre de 4 à 5°C comme c'est le cas pour les microalgues appartenant au genre *Dunaliella* qui se développent dans des lacs hypersalins de l'Antarctique (Xu *et al.*, 1998). Les microalgues mésophiles se multiplient à des températures comprises entre 15 et 35°C se sont les microalgues les plus abondantes en termes de diversité de genres et d'espèces (*Porphyridium*, *Tetraselmis*, *Chlorella*...). La microalgue *Celastrella sp.* est thermo-tolérante et peut se développer à des températures supérieures à 35°C, elle accumule des pigments (astaxanthine, lutéine, canthaxanthine et bêta-carotène), des triglycérides, et se développe à des températures allant jusqu'à 50°C avec un optimum de croissance à 45°C (Hua *et al.*, 2013). La température de culture des microalgues influence leurs métabolismes et donc la production de molécules. Les différentes espèces d'algues n'ont pas une sensibilité équivalente aux changements de températures. Ainsi, les microalgues de l'espèce *Scenedesmus sp.*, une microalgue mésophile, sont en mesure de s'adapter à des changements de température de leur milieu de culture. Selon Xin *et al.*, (2011) les courbes de croissance de *Scenedesmus* sont parallèles lors de la phase de croissance puis elles se superposent en phase stationnaire pour des températures de 20, 25 et 30°C, avec une biomasse moyenne de $8,47 \cdot 10^6 \pm 0,55$ cellules. mL^{-1} . Pour des cultures à 10°C la microalgue a besoin d'un temps d'adaptation de trois jours avant de croître de la même manière qu'aux autres températures. Au final, la biomasse produite est similaire pour les quatre conditions de température. Cependant le taux de croissance est plus important à 25°C ($0,8 \text{ j}^{-1}$). Les microalgues de l'espèce *Chlorella vulgaris* qui ont une croissance optimale entre 25 et 30°C s'adaptent également aux changements de température mais sont incapables de se développer au-delà de 38°C. Par opposition, *Nannochloropsis oculata*, qui présente une croissance optimale à 20°C est plus sensible aux changements de température avec une croissance divisée par deux à 15 et 25°C (Converti et

al., 2009). La température a également des effets sur la production de lipides par les microalgues.

I.2.1.7. Le pH

De même que pour la température, il existe différents comportements métaboliques et physiologiques de microalgues, face au pH de leur milieu de culture. La plupart des microalgues sont alcalophiles et se développent dans des milieux de culture de pH compris entre 7 et 10,5. Ainsi, les microalgues du genre *Scenedesmus* peuvent survivre à des variations de pH allant de 5 à 11 mais montrent un optimum de développement pour un pH compris entre 9 et 11.

A noter que pour ces pH fortement basiques, on assiste à un phénomène d'autofloculation (formation d'agrégat par les cellules) qui n'interfère pas avec la croissance des microalgues. Le pH n'a pas d'influence notable sur la composition et la production de métabolites tels que les lipides. (Vidyashankar *et al.*, 2013). A l'opposé, il existe des algues qui se développent à pH acide. Ainsi, *Chlamydomonas acidophila* est une microalgue acidophile qui pousse à des pH compris entre 2 et 9 avec un optimal de croissance pour un pH de 6 (Cuaresma *et al.*, 2006).

I.2.1.8. Salinité du milieu

Du fait de leur capacité à s'adapter à une large gamme d'environnements, les microalgues sont en mesure de supporter des milieux aux propriétés physico-chimiques extrêmement variées. Ainsi certaines microalgues sont adaptées à l'eau douce (*Chlorella*, *Synura*, *Oscillatoria*...), d'autres aux milieux marins (*Rhodella*, *Porphyridium*...) et certaines sont halophiles (*Gyrodinium*, *Dunaliella*...). Les microalgues marines peuvent s'adapter à des milieux de concentrations en sel (*NaCl*) de 10% à 50% (m/v) en fonction de la microalgue. Au-delà de ces valeurs seuil, la croissance cellulaire est ralentie voire même stoppée (Turner, Eggert *et al.*, 2007). Lorsque la concentration en sel devient trop importante pour la microalgue marine, il se crée un stress osmotique qui induit des changements dans son métabolisme. L'excès de sel n'a pas d'effet létal sur les cellules de microalgues marines qui sont protégées grâce à des systèmes d'adaptations de la photosynthèse, de la production de glucides, de pigments et de lipides.

Les algues *Dunaliella viridis* augmentent l'expression d'un gène codant pour la sous unité 26S du protéasome (responsable de la dégradation des protéines) en réponse à l'augmentation de la salinité externe. Ce phénomène indique, selon Sun *et al.*, (2010), que la tolérance à la salinité de *D. viridis* dépend de la capacité de la microalgue à dégrader ses protéines endommagées.

Les microalgues du genre *Scenedesmus* en conditions de stress salin (concentrations en *NaCl* de 50 à 100 mM), accumulent des lipides (triacylglycérols principalement saturés), des osmoprotecteurs tels que les polyols, ainsi que des caroténoïdes qui colorent les algues en brun. La morphologie de la microalgue est également modifiée et les cellules s'arrondissent.

L'ensemble de cette adaptation se fait au détriment de la croissance cellulaire (Vidyashankar *et al.*, 2013). Chez *Dunaliella* l'augmentation de la quantité de sel entraîne un stress hyperosmotique qui conduit à l'augmentation de glycérol intracellulaire. A contrario, un stress hypo-osmotique conduit à l'augmentation du catabolisme du glycérol (Goyal, 2007).

La teneur en bêta-carotène dans les cellules augmente d'un facteur 2 chez l'espèce *Dunaliella salina* soumise à un stress hyper-osmotique (*NaCl* 20% m/v) (Riyahi *et al.*, 2007). L'accroissement de la production de bêta-carotène serait la conséquence de

l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène (O_2 et H_2O_2) qui induiraient la transcription du gène de la biosynthèse du bêta-carotène (Phillips et al., 1995).

Lors de stress osmotiques, *Bangiopsis subimplex* produit des polyols qui sont des osmolytes organiques qui équilibrent la pression osmotique de part et d'autre de la membrane cellulaire (Eggert et al., 2007). De même, certaines microalgues et notamment les microalgues marines rouges (Rhodophytes) produisent un exopolysaccharide qui forme un mucilage autour des cellules en cas de stress osmotique. Cette capsule glucidique permet de limiter les échanges ioniques et de protéger les cellules (Turner, 1970).

I.2.2. Caractéristiques intrinsèques du photobioréacteur

I.2.2.1. Agitation

Les cultures de microalgues ont besoin d'être mélangées, continuellement ou non selon les espèces, pour plusieurs raisons (Richmond, 2004) :

- Prévenir la sédimentation algale ;
- Prévenir la formation d'un gradient de nutriment ou de gaz ;
- Déplacer les cellules dans le gradient de lumière, cela diminue la photolimitation et photoinhibition (Chisti, 2007) ;
- Diminuer la concentration en oxygène dissous ;
- Augmenter les échanges de nutriments et les transferts de masse.

Le mélange est un facteur important pour avoir un grand rendement en biomasse car cela augmente la productivité et la concentration optimale (Richmond, 2004).

L'augmentation de la turbulence du milieu permet aussi d'augmenter les échanges de nutriments et de métabolites entre les cellules et le milieu de culture. Cependant, les algues étant sensibles au cisaillement (Chisti, 2007), tous les types de mélange ne sont pas utilisables (comme les pompes centrifuges). Les forts régimes de turbulence ne sont généralement pas utilisés avec les microalgues car l'augmentation de la turbulence augmente le risque de dommages cellulaires. Les dommages cellulaires sont très probables en airlift ou en colonne à bulles à de fortes turbulences, (Miron et al., 1999). Les dommages cellulaires sont dus à :

- La force hydrodynamique sur les cellules due au mélange ;
- L'interaction des cellules avec les bulles ascendantes et coalescentes et aussi avec celles au niveau de la surface.

D'après Richmond, 2004, quand la concentration en biomasse est faible, le mélange ou non ne fait pas de différence.

I.2.2.2. Eclairage

Un bon éclairage est indispensable pour une croissance cellulaire importante. Les dispositifs d'éclairage peuvent être naturels exploitant directement l'énergie solaire ou bien artificiels à travers l'emploi de tubes fluorescents autour du réacteur ou de sources lumineuses immergées dans la culture (*LED* ou fibre optique). La conception de ce genre de dispositif doit prendre en compte des paramètres variés (chemin optique, profondeur optique (proportion de lumière absorbée ou diffusée le long d'un chemin lumineux par un milieu partiellement transparent) et ratio surface éclairée par volume de culture). La disponibilité de la lumière varie selon la profondeur et la densité cellulaire du milieu de culture. Plusieurs

études se sont intéressées à la distribution de la lumière au sein du réacteur et à la conception de systèmes efficaces pour la séquestration de CO_2 et la production en biomasse (Morita et al., 2000).

I.2.3. Système de cultures des microalgues

La culture à l'échelle laboratoire et semi-industrielle est déjà bien étudiée, connue et est maîtrisée, ce qui n'est pas encore le cas pour la culture à grande échelle (Singh et Sharma, 2012). Deux moyens principaux de cultures de microalgues ont été développés (Olaiwola, 2003), aussi bien à l'échelle laboratoire qu'à l'échelle industrielle. Les systèmes ouverts, où une partie importante de la culture est exposée à l'atmosphère, communément appelés bassins. Les systèmes fermés, où les cultures n'ont pas, ou peu, de contact direct avec l'atmosphère. Ces systèmes sont appelés photobioréacteurs. (Grobelaar and Kurano, 2003). Le choix du système de production dépend du degré de contrôle nécessaire à la production du produit voulu et de sa valeur (Apt and Behrens, 1999). Au niveau industriel, les microalgues sont souvent cultivées en bassin mais la production de molécules à haute valeur ajoutée ne peut pas se faire en système ouvert (Camacho Rubio et al., 1999).

I.2.3.1. Systèmes ouverts

Les systèmes ouverts sont les systèmes d'exploitation qui ont été majoritairement utilisés pour la culture industrielle des microalgues dans les dernières décennies. Les systèmes ouverts sont plus faciles et moins chers à construire et à exploiter que les réacteurs fermés.

Ces systèmes sont les moins énergivores et ont une maintenance et un nettoyage facile (Brennan and Owende, 2010). C'est pour ces raisons qu'ils sont considérés à l'heure actuelle comme des systèmes de cultures viables (Langley et al., 2012), malgré leur faible productivité. Les systèmes ouverts utilisent généralement que la lumière naturelle, il n'y a donc pas de coût associé à l'apport de lumière. Cependant, les microalgues sont soumises aux variations journalières et saisonnières de la température et de l'intensité lumineuse, mais la principale contrainte reste le risque de contamination. C'est pourquoi les cultures actuelles se faisant à ciel ouvert concernent des espèces de microalgues poussant dans des milieux très sélectifs. Trois microalgues sont cultivées actuellement avec succès en milieu ouvert : la spiruline (fort pH), la chlorelle (très riche en nutriment) ou la *Dunaliella salina* (milieu hypersalin). Le milieu de culture peut être contaminé par d'autres espèces de microalgues ou d'autres microorganismes comme des bactéries ou des protozoaires.

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

a) Les bassins naturels

Ces bassins non mélangés, aux conditions climatiques et nutritionnelles nécessaires aux microalgues, sont souvent utilisés pour la culture de *Dunaliella salina* ou pour la Spiruline. Ils ont en général une faible productivité ($<1 \text{ g.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$) (figure 12a).

b) Les bassins circulaires

Principalement utilisés en Asie pour la culture de Chlorella, ils nécessitent un fort investissement en matériel et leur agitation, par un bras rotatif placé au centre, consomme beaucoup d'énergie (Tredici, 2004).

c) Les raceways

Ce sont les bassins les plus utilisés depuis leur début dans les années 50 (Christenson et Sims, 2011), majoritairement pour la culture de Spiruline (figure 12). Leur principe est de

faire circuler les algues sur une faible largeur et profondeur (entre 15 et 50 cm) mais sur une grande distance.



Figure 12 : Bassins :
 a) Culture de *Dunaliella salina* en bassins naturels de 200 ha, Cognis nutrition (Australie)
 b) Culture de Spiruline en raceway, Californie (Andersen, 2005)

La circulation et le mélange s'effectuent grâce à des roues à aubes. La productivité de ces bassins est d'environ $20\text{-}25 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{j}^{-1}$, pour une concentration cellulaire inférieure à $0,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Tredici, 2004). L'utilisation de CO_2 n'est pas efficace dans les raceway et il y a un faible mélange (Chisti, 2007) (figure 12b).

I.2.3.2. Systèmes fermés

Les photobioréacteurs sont des réacteurs fabriqués à partir de matériaux transparents. Leur conception est basée sur la surface éclairée, l'efficacité du mélange et le contrôle des paramètres de culture (température, teneur en dioxyde de carbone et en oxygène, pH), pour atteindre une productivité maximale. Les systèmes fermés ont été conçus pour pallier les problèmes des bassins (Brennan and Owende, 2010). Ils offrent un environnement de culture clos, ils protègent la culture des contaminations directes, permettent un meilleur contrôle des conditions de cultures : la température est contrôlée efficacement, l'accès à la lumière est augmenté par rapport au bassin, l'évaporation du milieu de culture est minimisée, l'approvisionnement en CO_2 est facilité et ses pertes sont limitées (Contreras et al., 1998a). Le photobioréacteur permet la disposition efficace de la lumière mais aussi l'enlèvement de l'oxygène produit par la photosynthèse (Babcock et al., 2002). Grâce à ce contrôle des paramètres, des microalgues plus fragiles peuvent y être cultivées. Les photobioréacteurs permettent la reproductibilité des conditions de culture ainsi qu'une forte concentration cellulaire et une forte productivité. Les bassins ont une faible productivité ($0,05$ à $0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$) et de faibles concentrations cellulaires ($<1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) par rapport aux photobioréacteurs (concentration supérieure à $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ et productivité supérieure à $0,8$ à $1,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$) (Pulz, 2001).

Cependant, d'après Sierra et al., (2008), la conception des photobioréacteurs doit être optimisée pour chaque espèce de microalgues, par rapport à ses caractéristiques physiologiques et à ses caractéristiques de croissance. De plus, les photobioréacteurs restent très chers à produire et à exploiter.

Les photobioréacteurs existent sous de nombreuses formes, mais ils peuvent être séparés en plusieurs catégories : les photobioréacteurs plans, les photobioréacteurs cylindriques, les photobioréacteurs « Plastic bag » et un type particulier de réacteurs pour la culture de microalgues en l'absence de lumière (les fermenteurs).

a) Les photobioréacteurs plans

Apparus dans les années 50, ces photobioréacteurs ont des avantages pour la culture de masse (Sierra et *al.*, 2008). Les photobioréacteurs plans sont des réacteurs de faibles épaisseurs, généralement inférieures à 10 cm (Chisti, 2007), cela permet de réduire le chemin lumineux (Degen et *al.*, 2001). Ils sont disposés verticalement ou horizontalement avec une certaine inclinaison pour maximiser l'intensité lumineuse incidente (Chisti, 2007). Les plaques utilisées peuvent être des panneaux de verres ou des plaques alvéolaires en polymère (figure 13).

La productivité de ce système va de 24 à 50 g.m⁻².j⁻¹. La circulation s'effectue par pompe ou injection d'air. De manière générale, moins l'épaisseur de culture est importante, plus la productivité sera élevée, mais il existe une épaisseur optimale pour chaque espèce de microalgue permettant d'obtenir une productivité maximale. D'après Hu et *al.*, (1998), les photobioréacteurs plans d'une épaisseur d'un centimètre ont un meilleur taux de croissance et une meilleure productivité. L'avantage de ce système est une grande surface d'illumination (Razzak et *al.*, 2013). Le problème principal de ce type de photobioréacteur est que le CO₂ est très mal absorbé. Ces systèmes peuvent aussi accumuler une forte concentration en oxygène dissous (Tredici, 2004), ce qui inhibe la photosynthèse, et le contrôle de la température est difficile (Razzak et *al.*, 2013).



Figure 13 : Photobioréacteur plan
(Bitog et *al.*, 2011)

b) Les photobioréacteurs de type cylindrique

b.1) Type colonne

Les photobioréacteurs en colonnes sont les plus employés pour les petites productions de microalgues comme pour les écloseries. Plusieurs formes de colonnes existent comme de simples colonnes à bulles, des photobioréacteurs annulaires et des photobioréacteurs à circulation par air (ou airlifts).

b.2) Colonnes à bulles et colonnes annulaires

La colonne à bulles est un cylindre vertical en matériau transparent, de diamètre variable, mais assez faible pour laisser passer la lumière jusqu'au centre de la culture (figure 14). Le système est éclairé par des tubes fluorescents situés sur les côtés. Les colonnes à bulles sont mélangées et aérées par injection d'air par le bas. Les colonnes à bulles sont généralement utilisées dans l'industrie chimique, les fermentations biologiques et les traitements d'eaux usées (Lu et *al.*, 1995).



Figure 14 : Colonne à bulles
(FAO, 1996)

Les photobioréacteurs annulaires, composés de deux cylindres concentriques sont éclairés en leur centre par des néons, c'est la seule différence avec les colonnes à bulles. Les cultures sont généralement réalisées en batch, où tous les nutriments sont apportés en une seule fois au début de la culture.

c) Les airlifts

Les photobioréacteurs dits airlift ou à circulation par air sont des systèmes gaz/liquide caractérisés par la circulation du fluide qui est cyclique (Merchuk and Gluz, 1999). Ils sont composés de deux sections distinctes : la colonne ascendante (riser en anglais) et la colonne descendante (down comer en anglais). Ces deux sections sont interconnectées par le haut et par le bas (Chisti, 1989). Deux types d'airlifts existent : le photobioréacteur est désigné airlift interne à cause de la présence d'une chicane ou de deux cylindres concentriques, ou il peut être nommé airlift externe (Merchuk and Gluz, 1999).

Les airlifts ont de nombreux avantages (Razzak et *al.*, 2013) :

- L'excellent contact entre les phases gazeuse et liquide permet l'enlèvement des gaz produits, le mélange du milieu, la diminution du stress lié au cisaillement sur les cellules, l'absence de différents gradients (température, nutriments) et un bon taux de transfert de chaleur ;
- Il y a moins de risque de contaminations ;
- L'efficacité de l'aération et la performance de l'aération sont peu sensibles aux changements des conditions opératoires ;
- Faible énergie de fonctionnement ;
- Le mélange est contrôlé.
- Les airlifts ont aussi des inconvénients (Razzak et *al.*, 2013) :
 - Ils ont un grand coût de construction et une faible surface d'illumination.

L'airlift peut aussi se combiner à un photobioréacteur et lui servir de pompe pour la circulation du liquide (Chisti, 2007).

d) Type tubulaire

Les photobioréacteurs tubulaires sont des tubes de faibles diamètres (entre 2 et 6 cm environ (Miron et *al.*, 1999)) pour permettre la disponibilité de la lumière au centre de la culture. Ils peuvent atteindre des longueurs très importantes (jusqu'à 500 km), ils sont agencés de manières variables (verticalement ou horizontalement) sous forme de serpentins, parallèles, enroulés hélicoïdalement (figure 15). Pour des raisons de structures, ils sont limités à une hauteur de 4 mètres (Miron et *al.*, 2000). Faits de matériaux transparents, ils sont souvent conçus en verre ou en matière plastique (Chisti, 2007). Ils peuvent être éclairés par des tubes fluorescents ou simplement exposés à la lumière du soleil. L'apport en nutriment, en CO_2 et en milieu est généralement effectué par une cuve annexe aux tubes.

Les photobioréacteurs tubulaires sont les seuls systèmes fermés à être utilisés à grande échelle (Christenson and Sims, 2011), ces systèmes ont une bonne productivité en biomasse (Brennan and Owende, 2010). Cependant, ce type de photobioréacteur rencontre des problèmes d'accumulation d'oxygène et de contrôle de la température et ils ont aussi des problèmes d'encrassement (Brennan and Owende, 2010). De plus, ils occupent une grande surface au sol et sont chers à construire (Miron et *al.*, 1999).



Figure 15 : Photobioréacteurs tubulaires (horizontaux)

e) Photobioréacteur « Plastic-bag » ou gaine

Ces photobioréacteurs sont des gaines en plastiques, suspendues à chaque extrémité à une structure en métal et généralement éclairées par des néons. D'environ une centaine de litres de culture, le milieu est mélangé par aération (figure 16). La culture peut se faire en continu ou en batch. Ce système a un faible ratio surface/volume et peut avoir des problèmes d'encrassement. Ce système est encore utilisé par certaines entreprises pour sa simplicité et sa facilité d'utilisation (Rengel, 2010).



Figure 16 : Système « Plastic bag »
(Pulz, 2007)

f) Les fermenteurs

Un autre type de réacteur existe pour la culture de microalgues : les fermenteurs. Certaines espèces de microalgues peuvent croître en hétérotrophie, c'est à dire sans lumière et avec comme source de carbone des composés organiques comme du sucre. Le système des fermenteurs est une technologie bien connue, sophistiquée et qui existe à grande échelle (jusqu'à 500000 L). Tous les paramètres de la croissance sont facilement contrôlables (Brennan and Owende, 2010). La culture en hétérotrophie est moins chère (< 6 €/kg de biomasse produite (Tredici, 2004) que la culture photosynthétique en photobioréacteur mais tous les composés moléculaires ne peuvent être produits par cette technique (Degen et *al.*, 2001).

I.2.4. Modes de culture

Un procédé mettant en œuvre la culture des microalgues autotrophes dans un PBR peut fonctionner sous différents modes. On distingue en particulier le mode discontinu (ou *batch*) et le mode continu.

I.2.4.1. Culture en mode discontinu

Une culture en discontinu est par définition une culture durant laquelle aucun substrat (à l'exception de la lumière, voire le CO_2) sera introduit dans le réacteur. C'est le mode le plus courant dans la culture des microalgues (Richmond, 2004). Une quantité définie du milieu de culture et de l'inoculum est injectée dans l'enceinte de culture, où les cellules seront incubées dans des conditions environnementales favorables. Les cultures en mode discontinu sont largement utilisées pour la production commerciale des microalgues, de par la facilité de leur mode opératoire et la simplicité des systèmes de cultures nécessaires.

I.2.4.2. Culture en mode continu

Dans le cas des cultures en mode continu, le réacteur sera alimenté en permanence par du milieu neuf contenant les nutriments. Cela nécessite d'effectuer un soutirage afin de garder un volume constant dans le PBR. Bien que ce mode de culture paraisse très intéressant puisqu'il demande moins de main d'œuvre (ensemencement, nettoyage, stérilisation etc.), il est parfois difficile de le mettre en œuvre car plus complexe techniquement (robustesse du fonctionnement des pompes d'alimentation en milieu neuf, du système de régulation de pH, de la température etc.). Ce mode apporte toutefois l'avantage de mener à un état stable de la biomasse, quantitativement et qualitativement.

Ceci se révèle notamment intéressant dans le but d'étudier l'effet d'un facteur limitant particulier.

Dans le mode continu, il existe deux façons d'opérer le procédé : le mode *chemostat* et le mode *turbidostat*. Le premier correspond au mode continu pour lequel le milieu neuf est injecté en permanence avec un débit fixe Q_e (débit imposé par la pompe d'alimentation).

En régime stabilisé (volume réactionnel constant), Q_e est égal au débit de sortie de soutirage Q_s (par trop-plein, ou en utilisant une pompe de soutirage). La concentration en biomasse atteinte à l'équilibre dépend du débit d'alimentation imposé. Le mode turbidostat est obtenu par fixation de la concentration en biomasse dans le réacteur alors mesurée en ligne. Le système est pour cela asservi à un pilotage de la pompe d'injection du milieu neuf afin de garder une concentration en biomasse constante par dilution de la culture.

À noter qu'il existe un mode de fonctionnement nommé fed-batch durant lequel le réacteur est alimenté en continu ou en intermittence par du milieu neuf contenant un ou plusieurs nutriments avec un soutirage périodique de la biomasse produite dans le réacteur. Ce mode de fonctionnement est parfois utilisé dans l'exploitation commerciale des microalgues (Lee, 1997).

La figure (17) reprend schématiquement les deux modes de cultures continus. Quelques paramètres importants y sont définis :

- Q_e est le débit d'alimentation en milieu neuf (L/h).
- Q_s est le débit de soutirage de la biomasse (sachant que $Q_e = Q_s$) (L/h).
- V_R est le volume effectif de la suspension algale dans le réacteur (L ou m³).
- C_x est la concentration en biomasse (g/L).
- D est le taux de dilution (taux de renouvellement du milieu) (h⁻¹).
- t est le temps de résidence (ou temps de passage) (h).

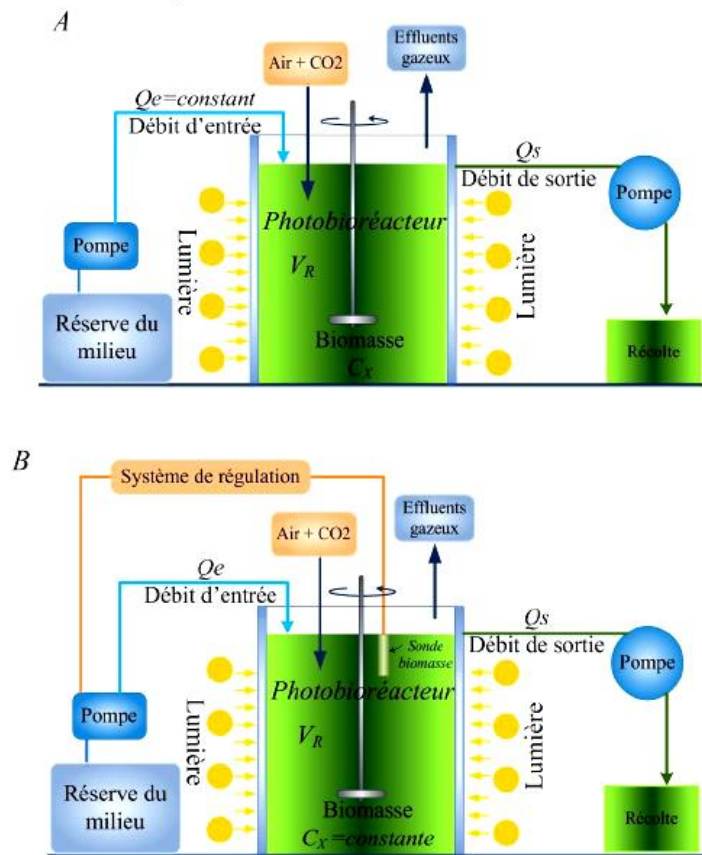


Figure 17 : Présentation schématique des modes de fonctionnement en continu d'un PBR. A : mode de fonctionnement en chemostat, dans ce cas le débit d'entrée est maintenu constant. B : mode de fonctionnement en *turbidostat*, la biomasse est maintenue constante en utilisant une sonde de mesure de biomasse et un système de régulation qui pilote la pompe d'alimentation du milieu neuf (consigne biomasse fixée par l'utilisateur)

I.3. Applications des microalgues

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

I.3.1. Domaine alimentaire

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

Au niveau de l'alimentation humaine, deux espèces de microalgues, *Chlorella* et *Spirulina*, dominent le marché mondial. L'apport de la biomasse microalgale peut se traduire par un effet général immuno-modulateur (Osinga et *al.*, 1999). La biomasse peut également être source d'aliments fonctionnels « alicaments » ; de ce fait, le marché des aliments fonctionnels représente un des marchés les plus dynamiques de l'industrie alimentaire.

Plusieurs pays, dont l'Allemagne, la France, le Japon, la Chine et la Thaïlande, ont ainsi commencé à orienter leur secteur alimentaire vers le marché des aliments fonctionnels issus des microalgues et des cyanobactéries comme sources de protéines, de vitamines (Pulz et *al.*, 2004). Les microalgues sont considérées comme une source potentielle d'AGPI (Jiang et *al.*, 1999), destinée à l'alimentation humaine et animale. Ces organismes sont susceptibles de synthétiser des AGPI de la série $\omega 3$ comme l'acide eicosapentaénoïque « EPA », l'acide

docosahexaénoïque « DHA » et l'acide α -linoléique « LNA », et les AGPI de la série $\omega 6$ comme l'acide arachidonique « AA » et l'acide linoléique « LA ». Ces AGPI sont utilisés en nutrition humaine et animale pour leurs vertus thérapeutiques sur certaines maladies. Les microalgues ont un potentiel intéressant de production de pigments (Lorenz and Cysewski, 2000). Les caroténoïdes sont de plus en plus employés dans l'industrie alimentaire, suite à la pression du consommateur et à l'augmentation des réglementations limitant l'utilisation des colorants artificiels (Gordon and Bouernfeind, 1982). Le β -carotène est un pigment synthétisé par l'algue *Dunaliella* et est utilisé comme colorant en industrie alimentaire. D'autres caroténoïdes, tel que l'astaxanthine synthétisé par l'algue *Haematococcus*, la lutéine, zéaxanthine et canthaxanthine sont des antioxydants utilisés en alimentation humaine, animale et en aquaculture. Les phycobiliprotéines sont des pigments qui peuvent être utilisés comme colorants naturels en industrie alimentaire (comme l'huile de soja (Gouveia et al., 2007)). Les polysaccharides (polymères hydrosolubles) issues des microalgues sont exploités dans l'industrie agroalimentaire en tant que agents gélifiants ou épaississants (De la Noüe et al., 1988). Le glycérol (molécule intervenant dans les systèmes d'osmorégulation des microalgues), est exploité dans l'agroalimentaire comme édulcorant. C'est l'algue *Dunaliella salina* qui en est la plus riche.

1.3.2. Domaine pharmaceutique

Au vu de leur grande diversité biochimique, les microalgues représentent une source intéressante de molécules bioactives et de toxines utilisables dans le développement de nouveaux médicaments. Plusieurs études ont permis de mettre en évidence l'implication des microalgues dans le domaine pharmaceutique par l'identification de nouvelles molécules naturelles (Hoppe, 1979). Dans ce sens, la tubercidine, une molécule cytotoxique, a été identifiée chez la microalgue *Tolythrix byssoidea* ainsi que chez les cyanobactéries (Patterson et al., 1991). Elle présente une action effective in vitro contre un type de leucémie lymphoïde. D'autres démarches ont été entreprises, entre autres par « l'Institut National du Cancer » avec un programme de dépistage visant des activités antivirales et anticancéreuses. Les microalgues peuvent synthétiser des sulfolipides antiviraux (Gustafson et al., 1989). Les cyanobactéries suscitent actuellement un réel intérêt pour le développement de nouvelles molécules ayant une activité antibiotique et pharmacologique (Borowitzka, 1999). Ainsi, des extraits sélectionnés de plus de 900 souches de cyanobactéries ont permis de mettre en évidence une action inhibitrice anti-HIV. Des effets antiparasitaires ont été également détectés chez les microalgues *Spirogyra* et *Oedogonium* (Pulz et al., 2004). Les caroténoïdes ont des propriétés intéressantes en termes de protection par rapport à certaines pathologies (Tapiero et al., 2004). La fucoxanthine est un caroténoïde utilisé à des fins médicales (Moreau et al., 2006). Les phycobiliprotéines sont des chromoprotéines largement utilisées en immunologie, pour les marquages fluorescents (Fluorescence Activated Cell Sorting « FACS »), les immuno-essais, la microscopie en fluorescence et la cytométrie en flux « CMF » (Bermejo Román et al., 2002). Les polysaccharides extraits des microalgues trouvent des applications industrielles et commerciales dans le domaine médical (activités antioxydantes, antivirales, anti-tumorales et anticoagulantes (Mayer and Hamann, 2004). Plusieurs molécules sont extraites chez des *Cyanobactéries "Spirulina platensis"* ainsi que chez certaines espèces appartenant à la classe des *Rhodophycées "Porphyridium purpureum"* et des *"Chlorophycées"* (Pulz et al., 2004).

Les microalgues produisent une large gamme de vitamines. Les vitamines *B12* et *E* ont un intérêt commercial (Borowitzka, 1988). Certaines études se sont focalisées sur la production de la vitamine *E* par des microalgues marines *Dunaliella tertiolecta* et *Tetraselmis suecica* (Carballo-Cárdenas et al., 2003). Toutefois l'utilisation des vitamines algales reste à l'état de la recherche.

Ces organismes photosynthétiques sont capables de synthétiser des antioxydants naturels (Zhang et al., 2003). Ces molécules comprennent les caroténoïdes, les enzymes de la famille des superoxydes dismutases « *SOD* », les enzymes de type catalase et le glutathion peroxydase vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . D'autres composés tels la taurine et d'autres aminoacides soufrés, l'acide urique, pourraient aussi exercer une activité antioxydante (Muller-Feuga, 1996). L'intérêt de ces substances antioxydantes repose sur leur rôle dans diverses pathologies chroniques (athérosclérose, arthrose, cataracte, cancer, maladie de Parkinson etc.) ou aiguës (inflammation, choc septique, etc.). L'utilisation d'extraits de microalgues à forte teneur en antioxydants trouve des applications dans l'industrie pharmaceutique pour des thérapies contre certains types d'inflammation (Pulz et al., 2004). Des études récentes ont porté sur la recherche de nouvelles sources d'antioxydants parmi 23 microalgues (Li et al., 2006).

I.3.3. Domaine cosmétique

Plusieurs espèces de microalgues sont exploitées industriellement dans le domaine cosmétique, principalement les deux espèces *Arthrospira* et *Chlorella* (Stolz and Obermayer, 2005). Des extraits d'algues, ayant une activité antioxydante, sont exploités sur le marché dans la fabrication des produits de soin capillaire (Pulz et al., 2004), du visage et de la peau ainsi que dans les crèmes solaires. De même, la synthèse de protéines à partir de la souche *Arthrospira* entraîne une réparation des premiers signes de vieillissement de la peau alors que des extraits de *Chlorella vulgaris* permettent de stimuler la synthèse du collagène dans la peau induisant la réduction des rides (Spolaore et al., 2006). Les pigments issus des microalgues sont également utilisés dans le domaine cosmétique (Del Campo et al., 2000).

I.3.4. Domaine énergétique

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

I.3.4.1. 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 (Chynoweth, 2002). Cependant, des verrous techniques tels que l'accessibilité des nutriments et les coûts de production élevés sont limitant. Un moyen permettant de réduire les coûts est par exemple le couplage avec la production de métabolites secondaires à haute valeur ajoutée. Des espèces telles que *Gracilariasp.* et *Macrocystis* représentent d'excellents organismes producteurs de biométhane.

I.3.4.2. Production de biocarburant

Considérant le contexte mondial actuel (hausse du prix du pétrole, raréfaction des ressources fossiles, production de gaz à effet de serre...), il est intéressant de considérer les microalgues comme source de production de différents types de biocarburant : le bio-oil (Demirbas, 2006), et le biodiesel (Banerjee et al., 2002 ; Gavrilescu and Chisti, 2005).

I.3.4.3. Production de bio-oil

Le bio-oil représente une alternative intéressante aux biocarburants liquides. Il est produit par conversion thermochimique de la biomasse à haute température et en l'absence d'oxygène (Carlsson *et al.*, 2007). On distingue deux procédés différents : la pyrolyse et la liquéfaction thermochimique (Demirbas, 2000). Plusieurs études se sont intéressées à l'implication des microalgues dans la synthèse du bio-oil (Tsukahara and Sawayama, 2005 ; Demirbas, 2006). Les pistes d'amélioration de ce type de procédé concernent bien sûr les coûts de production, l'optimisation du système de culture et des étapes de séparation et de récolte. Au niveau laboratoire, il a été prouvé que la qualité du biocarburant est favorisée par une culture hétérotrophique et un contrôle des paramètres du système de culture (Miao *et al.*, 2004).

I.3.4.4. Production de biodiesel

La voie la plus intéressante concerne les biocarburants de deuxième et troisième générations (production d'éthanol à partir de matières lignocellulosiques et la production de biodiesel à partir des microalgues). Cette voie prometteuse permet de remédier aux principaux inconvénients observés pour les biocarburants de 1ère génération (concurrence avec la production alimentaire, sur-consommation d'eau, détérioration des sols) (Chisti, 2007). En raison de propriétés intéressantes (productivité importante de biomasse, activité photosynthétique élevée, grand potentiel de stockage lipidique), les microalgues sont efficaces pour la synthèse de biodiesel, 500 à 1000 fois plus efficaces que les espèces terrestres (Doré Deschênes, 2009), notamment *Chlorella sp.* (Rasoul-Amini, 2011). Certains pays, dont les USA, ont accentué leur recherche dans cette direction avec la création d'entreprises telles que « *Green fuel* » qui propose des bioréacteurs avec des algues pouvant contenir 80% de leur poids en huile servant par la suite à la fabrication du biodiesel. De même, ces réacteurs permettent également d'éliminer par temps ensoleillé, plus de 82% du CO_2 contenu dans les effluents gazeux des centrales thermiques ainsi que 86% d'oxydes d'azote impliqués dans le phénomène d'effet de serre.

I.3.4.5. Production de bio-hydrogène

Le bio-hydrogène est une source efficace d'énergie renouvelable qui suscite actuellement de nombreuses recherches et applications. Cependant, aucune des techniques actuellement disponibles telles que l'électrolyse de l'eau ou la gazéification ou pyrolyse de la biomasse ne permettent d'assurer des coûts de production raisonnables. Les systèmes biologiques et plus spécialement les microalgues et les bactéries ont été étudiés à cette fin (Benemann, 1998). C'est Hans Gaffron qui fut à l'origine en 1939 de cette nouvelle voie de production de l'hydrogène impliquant des microalgues (Melis and Happe, 2006).

Le procédé de synthèse de bio-hydrogène 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, couplés à une réduction de la ferrédoxine (protéine intervenant au niveau du photosystème des algues dans le transport d'électron et des protons) induisant la synthèse de l'hydrogène par l'enzyme hydrogénase (Benemann, 2000). La méthode indirecte repose sur la conversion de l'amidon stocké par les algues sous forme d'hydrogène sous des conditions d'anaérobiose et de limitation de soufre (Carlsson *et al.*, 2007).

Plusieurs travaux ont confirmé l'implication des algues au niveau de la production de bio-hydrogène sous certaines conditions spécifiques (Rupprecht *et al.*, 2006 ; Hankamer *et al.*, 2007). Ces microalgues concernent la classe des Chlorophycées, les Cyanophycées, des cyanobactéries génétiquement modifiées ainsi que les espèces *Scenedesmus obliquus* (Gaffron and Rubin, 1942), *Chlorococcum littorale* et *Platymonas subcordiformis* (Guan *et*

al., 2004). L'espèce *Chlamydomonas reinhardtii* reste l'organisme le plus utilisé dans la recherche appliquée au bio-hydrogène (Melis and Happe, 2001). La problématique principale de ces systèmes réside dans l'inhibition de certaines enzymes de la classe de l'hydrogénase par l'oxygène généré suite au phénomène de dissociation de l'eau (Guan et *al.*, 2004). Une des solutions concerne la privation du milieu en soufre, permettant de réduire l'activité oxygénique durant la photosynthèse et d'induire des modifications métaboliques de la respiration (arrêt de la synthèse des composantes cellulaires tels que des sulfolipides et des protéines empêchant la division cellulaire, le photosystème PSII devient partiellement inactif impliquant une faible production de l'oxygène) dans le but d'éviter tous dommages cellulaires suite aux stress environnementaux (Ghirardi et *al.*, 2009 ; Melis, 2007). Plusieurs espèces de microalgues ont démontré une prédisposition intéressante vis-à-vis des procédés indirects, c'est-à-dire une grande capacité de synthèse de bio-hydrogène sous des conditions de privation de soufre (Skjanes, 2011). En conséquence, la production d'hydrogène à partir des micro-algues représente un créneau prometteur mais ceci nécessite plus de compréhension de l'ingénierie des microalgues (Beer et *al.*, 2009).

I.3.5. Domaine environnemental

Les principales applications environnementales sont le traitement des eaux usées et bien sûr la consommation de CO_2 comme méthode d'abattement de ce gaz à effet de serre.

I.3.5.1. Traitement des eaux usées

Au vu de leur capacité d'assimilation de nombreux nutriments nécessaires à leur croissance, les microalgues représentent une solution intéressante pour éliminer ces éléments ; elles sont également capables de fixer des métaux lourds. Elles sont ainsi les principaux éléments biologiques de certains systèmes de traitement des eaux municipales et industrielles (essentiellement traitement tertiaire). Grâce à l'absorption de l'azote et du phosphore, elles contribuent à réduire le phénomène d'eutrophisation de certains milieux aquatiques. Une étude ayant porté sur l'implication de *Chlorella vulgaris* dans l'absorption de l'azote et du phosphore des eaux usées (Aslan and Kapdan, 2006), a montré que l'oxygénation du milieu est facilitée par la production in situ de O_2 par la photosynthèse, permettant ainsi de réduire l'aération extérieure et limitant la fuite dans l'air des composés organiques volatils (Olguin, 2003 ; Muñoz and Guieysse, 2006). Certaines études ont eu recours à des algues vertes, principalement *Chlorella*, *Ankistrodesmus* et *Skeletonema*, pour les traitements des eaux usées issues d'usines de fabrication de pâte à papier ainsi que de production d'huile d'olive (Muñoz and Guieysse, 2006).

D'autres travaux ont porté sur l'élimination des métaux lourds des eaux usées (Bayramoğlu et *al.*, 2006 ; Raul Muñoz et *al.*, 2006), sur la biodégradation de contaminants toxiques tels que le Tributylétain "TBT" (Luan et *al.*, 2006).

Afin de réduire les coûts économiques de ces procédés de traitements des eaux, la biomasse générée peut être exploitée pour produire des molécules à haute valeur ajoutée, du biodiesel, du biogaz, de l'hydrogène etc. (Muñoz and Guieysse, 2006) Ces procédés sont généralement couplés à l'élimination de CO_2 dans des effluents gazeux industriels conduisant à des procédés intégrés.

I.3.5.2. Agriculture

La biomasse algale peut être valorisée comme engrais, fertilisant (apport de potassium, d'azote et d'éléments essentiels à la croissance végétale) et stabilisateur de sols dans le domaine de l'agriculture (Meeting, 1996), mais également d'accélérateur et protecteur de cultures en limitant la prolifération des épiphytes et des parasites. Les microalgues

permettent l'adhésion des particules et le stockage de l'eau dans les sols ainsi que la fixation de l'azote. De même, à partir de la synthèse de molécules bioactives, elles sont susceptibles d'influencer la croissance des plantes terrestres (Ördög et al., 1996). L'emploi des microalgues concerne par exemple la production du riz à travers la fixation de l'azote au niveau de l'agriculture tropicale et subtropicale, mais aussi le renforcement des surfaces dans les régions arides permettant de lutter contre le phénomène d'érosion (Pulz et al., 2004). De plus un nouvel intérêt est apparu pour certaines substances régulatrices ou protectrices dérivées des microalgues au niveau de la croissance des plantes.

I.3.5.3. Séquestration du CO_2

En raison de la situation actuelle alarmante relative au changement climatique, une prise de conscience de différents pays dans le monde a été observée pour y faire face. Par suite des émissions anthropiques, les gaz à effet de serre "GES", connus en anglais sous les initiales "GHC" ("Green house gas"), sont en concentration croissante dans l'atmosphère, ayant un effet de plus en plus fort sur le changement climatique (Matsumoto et al., 1995). En effet l'absorption naturelle ne permet plus de compenser le taux de production élevé de ces types de gaz, le dioxyde de carbone CO_2 étant le plus impactant avec plus de 68% des émissions totales (Global Warming, 2010 ; Kondili and Kaldellis, 2007 ; Roman- Leshkov et al., 2007). On observe une augmentation dramatique de la libération de CO_2 dans l'atmosphère, due aux sources anthropiques. On est passé de 7,4 milliards de tonnes de CO_2 libérés en 1997 jusqu'à plus de 26 milliards de tonnes estimés d'ici l'année 2100 (Zame, 2010). Il n'est pas besoin de rappeler les conséquences catastrophiques du réchauffement climatique sur la désertification, l'augmentation des phénomènes météorologiques extrêmes, les perturbations des écosystèmes, la fonte des glaciers non polaires induisant l'augmentation du niveau des océans (Morrissey and Justus, 1997).

Les Nations Unies ont mis en place en 1997 le protocole de Kyoto avec l'accord de plus de 170 pays afin de réduire les niveaux d'émission des gaz à effet de serre de 5,2% par rapport à 1990 (Gutierrez et al., 2008 ; Wang et al., 2008). Dans le même sens, en 2010, les Nations Unies ont proposé l'introduction du principe « crédit-carbone » avec un prix unitaire estimatif de 270 dollars américain par tonne (Ho et al., 2010). Le crédit carbone correspond à l'émission d'une tonne « d'équivalent carbone » par le biais des gaz à effet de serre. Ce système traduit le droit d'un pays ou d'une entreprise à émettre des gaz à effet de serre, en étant soumis à des taxes calculées sur la base de l'équivalent carbone. Des quotas d'émissions sont fixés par le protocole de Kyoto. Ce système, à travers un marché de négociation et d'échanges de droits d'émission de gaz à effet de serre (marché du carbone), permet à certains pays ou organismes d'acquérir ou de vendre ces crédits carbones en fonction de leurs besoins et de leurs objectifs.

Enfin lors de la convention sur le changement climatique tenue à Copenhague (2009), les nations participantes ont accepté de financer, d'ici 2020, à hauteur de 100 milliards de dollars américain, un programme de réduction des gaz à effet de serre (Kintisch, 2010).

Dans ce sens, de nombreuses recherches se sont focalisées sur le développement de nouvelles techniques d'abattement de CO_2 . On distingue trois principaux groupes de procédés : séquestration géologique, procédés chimiques et bioprocédés. La séquestration géologique repose majoritairement sur le stockage de CO_2 liquide ou gazeux dans des formations géologiques, dans le sol (Herzog, 2001) ou dans le fond des océans (Israelsson et al., 2009). Cependant ces techniques présentent de nombreux inconvénients tels que les possibilités de fuite, la contamination des aquifères potables, l'augmentation de l'acidité de l'eau, la perturbation de l'écosystème marin et un coût important. Les procédés chimiques comportent entre autres l'absorption dans des solutions alcalines (Diao et al., 2004),

l'utilisation de nanotubes de carbone multi-feuillets (Su et al., 2009), l'adsorption-neutralisation sur charbon actif recouvert d'amine (Plaza et al., 2007). Ces méthodes sont chères et gourmandes en énergie (Wang et al., 2008).

L'emploi de systèmes biologiques représente une solution alternative très prometteuse, relativement efficace, économiquement envisageable et durable. Ces méthodes reposent essentiellement sur la photosynthèse avec transformation de CO_2 en biomasse (Kondili et Kaldellis, 2007 ; Ragauskas et al., 2006). On distingue deux voies biologiques de séquestration de CO_2 : l'une utilisant les plantes terrestres et la seconde des microorganismes photosynthétiques. Concernant la première voie, les forêts permettent de convertir le CO_2 en structure cellulosique pour les plantes (notamment les arbres) et en humus pour les sols (Zame, 2010). Cependant, en raison d'une efficacité limitée de conversion, d'une faible vitesse de croissance et d'inconvénients économiques et techniques (possibilité de libération du carbone stocké suite à un incendie de forêt ou par l'endommagement des arbres), de nombreux chercheurs se sont orientés sur la deuxième voie qui est la mise en œuvre d'organismes photosynthétiques tels que les microalgues.

Ainsi, différentes études traitent de la capacité des microalgues à capter le CO_2 à partir de gaz de combustion (Ho et al., 2010). Les microorganismes ont une vitesse de croissance nettement supérieure à celle des plantes terrestres (Chisti, 2007 ; Li et al., 2008) et une activité photosynthétique 10 à 50 fois plus forte (Costa et al., 2000). Par ailleurs, ils sont capables de fixer biologiquement le CO_2 à partir de différentes sources : atmosphérique, gaz industriels et hydrogénéocarbonates solubles. D'autres travaux ont quantifié la production de biomasse (Chae et al., 2006). D'après Bilanovic et al., (2009), les microalgues sont capables de convertir plus de 9% de l'énergie solaire en 280 tonnes de biomasse sèche par hectare et par an, tout en consommant près de 513 tonnes de CO_2 .

I.4. Présentation du modèle d'étude

I.4.1. *Nannochloropsis gaditana*

Le genre *Nannochloropsis* a été décrit en premier par Hibberd (1981). C'est une microalgue eucaryotique appartenant à la classe des *Eustigmatophyceae* (tableau 4), est comprenant environ 6 espèces, dont cinq sont largement distribuées dans le plancton des écosystèmes marins, en particulier dans les eaux côtières, et sont reconnues dans les habitats salins (*N. oculata*, *N. salina*, *N. granulata*, *N. oceanica* et *N. gaditana*) (Andersen et al., 1998) tandis que la sixième espèce (*N. limnetica*) est rencontrée dans les eaux douces.

Toutes les espèces de *Nannochloropsis* sont des petites sphères dont le diamètre des cellules est inférieur à 5 μm , non motiles qui n'expriment pas des caractéristiques morphologiques distinctes, et ne peuvent pas être distinguées par la microscopie optique ou électronique (figure 18) (Fawley and Fawley, 2007). La caractérisation se fait principalement par le gène *rbcl* et l'analyse des séquences d'ADNr18S. Ce genre est bien connu comme étant une source potentielle d'acide eicosapentanoïque (20 :5 ω 3), un acide gras polyinsaturé utilisé en consommation humaine pour la prévention de plusieurs maladies. Récemment, le genre *Nannochloropsis* a été étudié pour la production de biocarburants du fait d'une grande capacité à accumuler des quantités importantes de lipides et surtout des lipides neutres (TAG) en réponse à des contraintes telles que la carence en azote et/ou en phosphore (Gouveia and Oliveira, 2009). Les microalgues appartenant à ce genre sont particulièrement intéressantes en raison de leur capacité à accumuler des grandes quantités de lipides, qui peuvent atteindre des concentrations allant jusqu'à 65-70% du poids sec total. *Nannochloropsis gaditana* est caractérisée par la présence de la chlorophylle a, le β carotène, la violaxantine, antheraxanthine, astaxantine, et zeaxantine) sont également présentes en

quantités beaucoup plus faibles. En comparaison aux autres espèces de *Nannochloropsis* ainsi qu'avec d'autres microalgues, *N gaditana* montre un rendement élève en lipides allant jusqu'à 65-70% du poids sec total. Par conséquent, cette espèce a émergé ces dernières années comme l'un des meilleurs candidats pour la production de biodiesel (Mekdade, 2017).

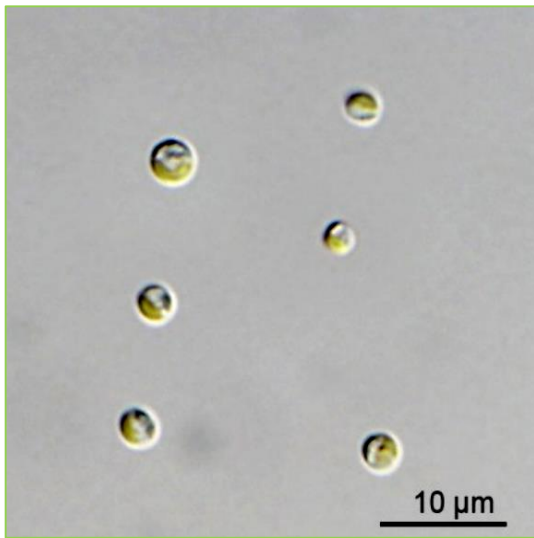


Figure 18 : Photo de la micro algue *Nannochloropsis* sp (Tanzi., 2013)

Tableau 4 : Classification de l'espèce *Nannochloropsis gaditana*

Embranchement :	Ochrophyta
Classe :	Eustigmatophyceae
Famille :	Monodopsidaceae
Genre :	<i>Nannochloropsis</i>
Espèce :	<i>Nannochloropsis gaditana</i>

I.4.2. *Tetranephris brasiliensis*

La microalgue *Tetranephris brasiliensis* est un organisme dulçaquicole de la famille des *chlorophycées* (tableau 5), représentatif des producteurs primaires. C'est une microalgue verte unicellulaire autotrophe obligatoire, vivant dans des étangs d'eau douce, lacs et rivières. Elle est considérée comme une microalgue pour sa petite taille (longueur variante entre 4,0 et 5,8 μm, et la largeur de 6,0 à 8,6 μm).

Le coenobium de *Tetranephris brasiliensis* est habituellement formé par quatre cellules en forme de rein avec les deux pôles également arrondis, mais parfois un pôle est quelque peu atténué. la partie convexe est face à l'extérieur du coenobium (figure 19),

La structure cellulaire interne est relativement simple, sous microscope la paroi cellulaire est mince et lisse. L'intérieur de la cellule est pratiquement occupé par un seul chloroplaste pariétal, qui souligne la paroi cellulaire, les pyrénoides sont absentes.

La reproduction se fait par formation d'autospores. Chaque cellule du coenobium produit quatre autospores, qui sont libérés par la rupture de cellule mère mur. La production d'autospores peut se produire simultanément dans les quatre cellules du coenobium (Leite and Bicudo, 1977).



Figure 19 : *Tetranephris brasiliensis* vu sous microscope optique (D'après Hoshina, 2014)

La classification taxonomique d'après Hindàk (1990) est la suivante :

Tableau 5 : Classification de l'espèce *Tetranephris brasiliensis*.

Embranchement :	Chlorophyta
Classe :	Chlorophyceae
Famille :	Scenedesmaceae
Genre :	<i>Tetranephris</i>
Espèce :	<i>Tetranephris brasiliensis</i>

I.4.3. *Scenedesmus* sp.

Scenedesmus appartient à la classe des *Chlorophyceae*, l'ordre des *Sphaeropleales* et la famille des *Scenedesmaceae* (tableau 6). Ce sont des microalgues vertes d'eau douce (Chlorophyta). Les cellules non motiles sont couramment organisées en forme de cénobies (figure 20) avec un nombre fixe de cellules dans une colonie : des multiples de deux, de quatre ou de huit cellules disposées obliquement en séries distinctes. Ces dernières sont fusiformes, égales, un peu ventrues au milieu, aigues à l'extrémité libre et subaiguës ou arrondies à l'intérieur. Les cellules mononucléaires ont, chacune, un seul chloroplaste pariétal en forme de plaque, stratifié qui constitue la majeure partie du volume de la cellule et le plus souvent un pyrénôïde (un granulé de protéine et de l'emplacement de la formation de l'amidon). À noter qu'en milieu à faible phosphore ou de faible concentration en sel, *Scenedesmus* est amenée à une croissance unicellulaire, formant environ des cellules elliptiques de 10 µm de longueur (Taleb, 2015).

Le genre *Scenedesmus* est très robuste et résistant et a donc été utilisé avec succès pour traiter des effluents tels que ceux des eaux usées de l'usine d'olive, du biogaz ou des terrains municipaux (Zhen-Feng et al., 2011). Le genre *Scenedesmus* est caractérisée par une tolérance aux hautes températures, une résistance à des irradiances intenses ainsi qu'une tolérance à de larges gammes de pH (entre 5 et 10) (Ho et al., 2010).

L'espèce *Scenedesmus obliquus* est la plus connue de ce genre. La concentration des lipides est faible dans les cellules cultivées en conditions favorables de croissance (12.7% du poids sec) (Mandal and Mallick, 2009) mais peut être stimulée lorsque les conditions deviennent défavorables.

Les composants majeurs de la biomasse de *S. obliquus* dans des conditions optimales de croissance sont des protéines (50-56 en pourcentage de poids sec), les carbohydrates (10-17%) et minoritairement les lipides (12-14%) (Richmond, 2008). Comme tout Chlorophyte,

Scenedesmus possède de la chlorophylle *a* et *b* et des caroténoïdes primaires tels que la lutéine, ainsi que des caroténoïdes secondaires et de l'astaxanthine comme produits accumulés sous conditions particulières d'accumulation.



Figure 20 : Photo d'une cénobie formée de huit cellules de la micro algue *Scenedesmus obliquus* (Qin et *al.*, 2008)

Tableau 6 : Classification de l'espèce *Scenedesmus sp.*

Embranchement :	Chlorophytes
Classe :	Chlorophycées
Ordre :	Chlorococcales
Famille :	Scénédesmacées
Genre :	<i>Scenedesmus</i>
Espèce :	<i>Scenedesmus sp.</i>

Chapitre II - Matériel et méthodes

II.1. Isolement et purification des souches

II.1.1. Cadre de l'échantillonnage

II.1.1.1. Spécificités de la région d'échantillonnage : l'estuaire de l'Oued Chélif

Les échantillons d'eau, ont été prélevés en 2014 au niveau de l'estuaire de l'Oued Chélif, qui constitue le plus long cours d'eau naturel en Algérie avec un bassin versant de 45000 km², cet Oued prend départ à proximité de la localité de Boualem (Wilaya d'El Bayadh) et se déverse dans la mer méditerranéenne à environ 15 km à l'est de la Wilaya de Mostaganem.

Bien qu'il soit peu navigable, car trop capricieux, les eaux boueuses de ce fleuve sont une richesse indispensable à toute vie. Il prend sa source sur la limite du Tell et du Sahara dans l'Atlas Saharien, plus précisément dans le Djebel Amour culminant à 1937 m, près d'Aflou. Il commence par couler du Sud vers le Nord, pour rejoindre au plus court la Méditerranée (Africain, 1998). L'échantillonnage s'effectue au niveau de deux stations près de l'embouchure S1 (30°02 03 94N, 0°08 28 50 E) et S2 (36°02 18 84N, 0°08 01 85 E) (figure 21) à l'aide d'un flacon polyéthylène stérile, l'eau recueillie est transportée par la suite dans une glacière au laboratoire AQUABIOR.



Figure 21 : Localisation des sites d'échantillonnage (S1) et (S2) au niveau de l'estuaire de l'Oued Cheliff (S1 (30°02 03 94N, 0°08 28 50 E) et S2 (36°02 18 84N, 0°08 01 85 E))

II.1.1.2. Mesures physico-chimiques

Pour les besoins de l'étude, le laboratoire a également acquis une sonde de mesure multi-paramètres (sonde Multi 1970i, WTW). La température, la salinité, la quantité d'oxygène

dissous et le pH ont donc été mesurés sur nos sites d'échantillonnage (tableau 7). Ces informations nous renseignent sur les conditions favorables de croissance des microalgues rencontrées. Elles s'avèreront utiles dans la seconde phase du projet pour approcher plus rapidement les conditions optimales à mettre en place.

Tableau 7 : Tableau représentatif des paramètres mesurés au niveau des sites d'échantillonnage

Paramètres mesurés	Valeurs (S1)	Valeurs (S2)
Température	18,7°C	17,4°C
Salinité	18,7 PSU	30,7 PSU
pH	7,48	7,82
Oxygène dissous	84,42 %	86,2 %

II.1.2. Description morphologique des taxons observés au niveau de l'estuaire de l'Oued Chélif

L'identification des microalgues composant les échantillons prélevés a été réalisée par observation des caractères phénotypiques des individus au microscope photonique (grossissement $\times 100$), un outil communément utilisé en taxinomie. Cette méthode peut cependant être soumise à quelques critiques. En effet, la physiologie des micro-organismes évolue en fonction de l'environnement dans lequel ils se développent. D'après la littérature, plusieurs caractères morphologiques peuvent permettre de distinguer les taxons, parmi lesquels nous avons choisis : la forme des cellules, la présence ou l'absence d'enveloppe gélatineuse, l'ornementation, ainsi que des mesures de dimensions grâce à un oculaire micrométrique, puis identifié morphologiquement en utilisant une clé d'identification (Carmelo, 2016).

Il faut toutefois savoir que l'utilisation d'outils phylogénétiques permet de vérifier la plupart des identifications.

II.1.3. Purification des souches isolée à partir de l'estuaire de l'Oued Chélif

100 ml de chaque échantillon ont été centrifugés dans des tubes coniques pendant 15 mn à 5500 rpm ; le culot est ensuite récupéré et dilué dans 50 ml d'eau distillée stérile puis filtré à travers un tissu à zooplancton (El-Mesbahi, 2014). L'isolement des taxons est réalisé en effectuant une série de dilutions sur milieu F/2 Guillard (annexe II) additionné d'une solution d'antibiotique. Pour ceci des plaques micro-puits peuvent être utilisées, il est également important d'avoir une idée de la densité en cellules dans l'échantillon de départ afin d'effectuer des dilutions adaptées. Cette méthode n'est pas utilisable quand il s'agit d'isoler des taxons rares, mais elle peut donner de bons résultats pour une espèce abondante. Un microscope optique inversé avec des objectifs de 10 à 40 fois est nécessaire (Rimet et *al.*, 2004).

Les cultures monoclonales peuvent-être maintenues en chambre de culture, où les conditions de température et d'éclairement sont contrôlées ($23\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ sous une intensité lumineuse de $100\ \mu\text{mol de photons m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ et un cycle de 12h de lumière/12h d'obscurité).

II.1.4. Provenance de la microalgue marine

Un échantillon de culture uni algale nous a été procuré par une entreprise algéro-espagnole PBA (Partisano Biotech Algérie), société mixte créée à parts égales entre deux industriels algériens.

II.1.5. Transfert et maintenance des cultures

Le transfert des cellules à partir de la culture monoclonale est effectué stérilement. Toutes les cultures sont inspectées sous microscope lors de chaque transfert pour détecter d'éventuelles contaminations. En cas d'infection, des traitements adéquats sont utilisés. En cas de présence de diatomées, on utilise le dioxyde de germanium (GeO_2) à une concentration finale de 1 à 10 mg/l. En effet, les diatomées se développent très rapidement, et elles peuvent souvent supplanter les espèces initialement isolées. (Lewin, 1966).

L'absorption de dioxyde de germanium se produit facilement chez les diatomées, se dernier remplace la silice dans les réactions biochimiques. Dans d'autres cas, la contamination est induite par des bactéries ou des cyanobactéries, d'où la nécessité d'un traitement d'antibiotiques pour éliminer ces procaryotes.

Les meilleurs résultats semblent se produire quand une culture en croissance active est exposée à un mélange de pénicilline, de la streptomycine et de la gentamycine (100, 25 et 25mg/l, relativement). La dose utilisée est de 0,5ml de mélange d'antibiotiques pour 50 ml de culture algale. Par ailleurs, si des contaminations biologiques apparaissent dans une culture, le meilleur remède est d'isoler une cellule unique de la culture à l'aide d'un microscope inversé, et de tenter d'établir une nouvelle culture monoclonale propre.

II.1.6. Identification des souches étudiées

II.1.6.1. Identification des souches étudiées par observation au microscope électronique à balayage (MEB)

- **Préparation en Microscopie Electronique à Balayage (MEB)**

La microscopie électronique à balayage permet d'obtenir des images de haute résolution de la surface des échantillons. Ces microscopes permettent, de par leur technologie, de réaliser une identification très précise du phytoplancton (Guiselin et *al.*, 2009).

La première étape consiste à fixer les échantillons. Il est nécessaire de les incuber dans le fixateur (glutaraldéhyde à 2,5% dans du tampon cacodylate de sodium à 0,1M pH 7, 2). Les échantillons sont ensuite déshydratés dans de l'éthanol à des concentrations croissantes (de 15% jusqu'à l'éthanol absolu). Pour finir, l'échantillon est placé sous une hotte (sorbonne) afin d'éliminer tout résidu liquide.

Une fois la déshydratation finalisée, l'échantillon est fixé sur un support spécifique au MEB (plot métallique) à l'aide d'une colle conductrice.

Pour que l'échantillon réémette les électrons à l'intérieur de la chambre d'observation du microscope, celui-ci doit être recouvert d'une fine couche de métal. Cette étape est réalisée à l'aide d'un métalliseur qui va permettre la mise en place de cette fine pellicule d'or d'environ 2 à 3 nm d'épaisseur.

L'échantillon ainsi préparé est prêt à être observé au microscope électronique à balayage (JEOL (JSM-7600F) (Paoli, 2014).



Figure 22 : Photo representative du microscope électronique à balayage (MEB), Université de Nantes (Laboratoire Mer Molecule Santé).

II.1.6.2. Identification des souches étudiées par les techniques de Biologie Moléculaire

- **Extraction de l'ADN**

L'ADN est extrait à partir de 10 ml de culture microalgale en phase exponentielle ($30 \cdot 10^6$ cellule /ml), en utilisant un kit (Easy Pure Plant Genomic DNA Kit) et suivant le protocole décrit en annexe I.

- **Techniques d'amplification de l'ADN (PCR)**

Chaque souche est identifiée au niveau du genre ou de l'espèce par séquençage d'un fragment du gène L'ADNr 18S après amplification génique (PCR) (PROFLEX (NC. 22)) à l'aide de primers eucaryotes universels (Lefranc *et al.*, 2005).

Les séquences des primers sont les suivantes :

NS51 (GGGGGAGTATGGTCGCAAGGC)

NS61 (TCAGTGTAGCGCGCGTGCGGC)

La PCR se déroule sur 1 cycle de dénaturation initiale de 3 min à 94°C suivi par 35 cycles de 3 min :

- 1 min à 95°C, pour dénaturer les ADN
- 1 min à 56°C, pour l'hybridation
- 1 min à 72°C pour l'élongation de l'ADN

Enfin une phase d'extension finale de 10 min à 72°C est réalisée.

Le fragment d'ADN 18S amplifié est analysé par électrophorèse en gel d'agarose (1% dans du tampon TAE : Tris, Acétate, EDTA) contenant du Bromure d'Etidium ($0,5 \mu\text{g. mL}^{-1}$) afin de vérifier l'absence d'amplifications parasites.

Un standard de masses moléculaires est déposé à proximité de l'échantillon pour pouvoir estimer la taille du fragment d'ADN.

- **Séquençage de l'ADN**

Les séquences des fragments d'ADN sont déterminées par le laboratoire Eurofins. La séquence partielle du gène codant l'ARNr 18S des deux souches isolées ont été déposées dans la banque GenBank data library sous le numéro d'accèsion MK253297 et MK256233 pour *Tetranephris brasiliensis* et *Scenedesmus sp.* respectivement.

- **Analyse et comparaison de séquences**

La séquence d'ADN obtenue est comparée avec d'autres séquences d'ADN 18S à l'aide de Blast (Altschul et *al.*, 1997) sur le site web de Gen Bank afin de déterminer leur affiliation phylogénétique.

Après avoir aligner les séquences, les arbres phylogénétiques ont été construit avec le programme Mega version 6 (Tamura et *al.*, 2005). Le logiciel permet de définir les distances entre les séquences.

II.2. Mise en culture

II.2.1. Dispositif expérimental : miniphotobioréacteur de 1000 ml

La campagne expérimentale mise en place pour la réalisation de la phase d'identification des paramètres de culture nécessaires repose sur des cultures en modes batch de nos trois souches.

Des flacons en verre transparent d'un volume de 1000 ml sont utilisés comme des "miniphotobioréacteurs" conçus au laboratoire pour la culture des microalgues.

Les cultures sont agitées grâce à un bullage d'air stérile (4 l/min) (CO_2 atmosphérique), l'éclairage est assuré par cinq néons de type LED (Sylvania professional 12 V, 30 W) disposés à 1 cm des miniphotobioreacteurs (figures 23-24) ce qui permet de générer des irradiances de $100 \mu\text{mol}$ de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, ces derniers sont connectés à un temporisateur (Legrand omnirex) afin de varier les photopériodes, La température est la salinité sont maintenue constantes à $23 \pm 1^\circ\text{C}$ et 30 PSU (microalgue marine) respectivement.

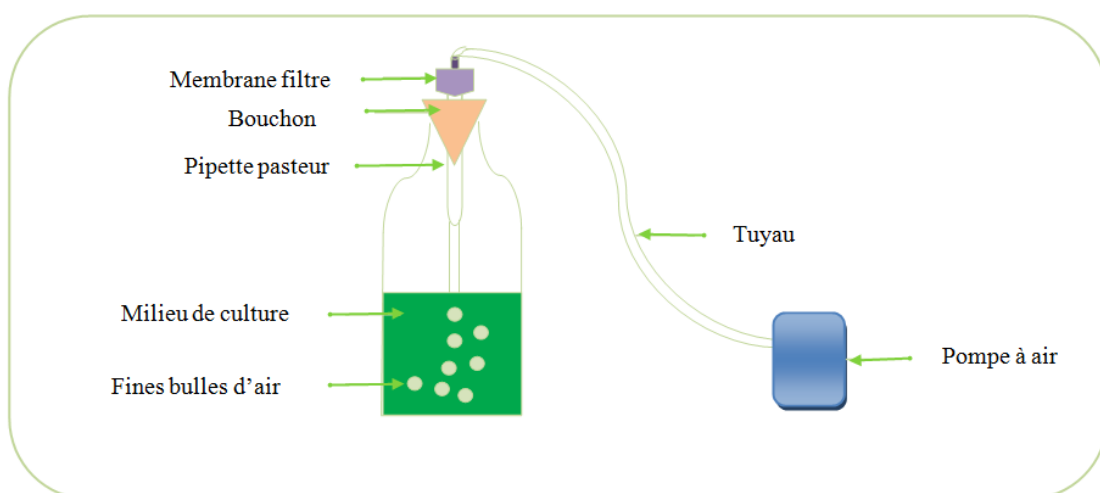


Figure 23 : Schéma du mini photobioréacteur à bullage d'air (AQUABIOR, 2017)



Figure 24 : Système de culture utilisé au cours de l'étude expérimentale (AQUABIOR, 2017)

II.2.2. Maintenance des cultures mères

La culture d'une microalgue dans un photobioréacteur présente diverses exigences relatives à la stérilisation complète du matériel utilisé au choix d'un milieu de culture permettant l'apport des principaux éléments nutritifs essentiels à la croissance et à l'entretien permanent de précultures et permettant ainsi d'inoculer le miniphotobioréacteur avec une concentration cellulaire suffisante.

Le début de chaque culture est caractérisé par une étape d'inoculation qui consiste à introduire l'inoculum (quantité de cellules algales mise en culture dans un système fermé à partir d'une souche mère) dans un milieu de culture stérile. On assiste à une dilution de la concentration cellulaire vers une valeur d'environ 2×10^6 cellules par millilitre. Une des conséquences de cette étape est la phase de latence qui caractérise l'acclimatation de ces cellules microalgales aux nouvelles conditions de culture. De ce fait, la réussite du démarrage d'une campagne expérimentale est conditionnée par la qualité de l'inoculum introduit dans le mini photobioréacteur.

Durant cette étude, nous avons eu recours à trois précultures dans des flacons d'Erlenmeyers de 1 litre. Elles sont rafraichies toutes les deux semaines, c'est-à-dire diluées de moitié avec le milieu de culture stérile afin de renouveler le milieu réactionnel en nutriments nécessaires à la croissance. Afin d'assurer une croissance suffisante et un entretien des microalgues, ces erlenmeyers sont conservés sous une Photopériode de 12h/12h à une intensité lumineuse fixée à $50 \mu\text{mol}$ de photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La température est régulée à sa valeur optimale ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), l'agitation est assurée par un mélange gazeux d'air contenant du CO_2 atmosphérique.

II.2.3. Choix du milieu de culture

La croissance des microalgues est fortement dépendante de la composition du milieu réactionnel. L'apport des éléments nutritifs doit être suffisamment important afin d'éviter toute carence susceptible d'affecter la croissance algale. Au cours de nos essais, nous avons opté pour le milieu de culture F/2 Guillard dont la composition est détaillée dans l'annexe II.

Le choix de ce milieu est justifié par l'apport nécessaire d'azote, de phosphore et des micro-éléments indispensables. En effet, sous ces conditions opératoires, la culture ne présente pas de carence. Le milieu choisi est donc adéquat pour caractériser la croissance des microalgues.

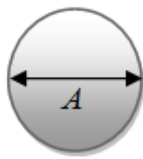
La stérilisation du F/2 Guillard s'effectue par voie thermique grâce à un autoclavage puis conservé dans un système frigorifique à une température de 4°C (température inhibant la prolifération de germes pathogènes).

II.2.4. Caractérisation qualitative et quantitative de la croissance en conditions optimales des souches cultivées en mini photobioréacteur

Toutes les souches de microalgues ont été cultivées en conditions de croissance optimales, dans des milieux de culture ajustés afin d'éviter toute limitation minérale.

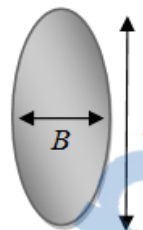
Après leur mise en culture dans les miniphotobioréacteurs en mode discontinu, à une intensité lumineuse $q_0 = 100 \mu\text{mol. de photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, la croissance des souches a été suivie en mesurant la concentration cellulaire ainsi que le taux de croissance (μ) et le temps de génération. Ensuite, la concentration en matière sèche a été mesurée à l'état stationnaire.

Le calcul du biovolume cellulaire et de la surface est effectué selon les formules d'un ensemble de modèles géométriques établies par (Sun and Liu, 2003).



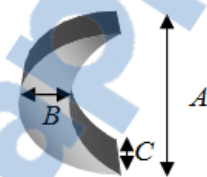
$$V = \frac{\pi}{6} A^3 \quad (3)$$

$$A = \pi A^2 \quad (4)$$



$$V = \frac{\pi}{6} B^2 A \quad (5)$$

$$A = \frac{\pi B}{2} \left(\frac{A^2}{\sqrt{A^2 - B^2}} \sin^{-1} \frac{\sqrt{A^2 - B^2}}{A} \right) \quad (6)$$



$$V = \frac{\pi}{4} A \cdot B \cdot C \quad (7)$$

$$A = \frac{\pi}{4} (AB + BC + AC) + AC \quad (8)$$

II.2.5. Comportement et adaptation des souches

Même en conditions optimales de croissance, la comparaison des souches n'est pas évidente. En effet, les microalgues présentent une adaptation forte aux conditions de culture. Lors d'un changement de conditions, comme notamment lors d'une simple inoculation dans un PBR, il peut s'ensuivre un temps plus ou moins long de latence.

Outre la caractérisation quantitative classique de la croissance des souches exprimée par des mesures du taux de croissance maximale, du temps de génération, de la biomasse maximale ainsi que la concentration de la matière sèche, la caractérisation qualitative qui se traduit par

le comportement observé en culture se révèle très importante dans la logique de la caractérisation des souches. Ainsi, la vitesse d'adaptation d'une souche à de nouvelles conditions de culture est un critère. La durée de la phase de latence des microalgues après inoculation a donc été considérée, la formation de biofilms et la sédimentation des cellules également car cela impacte la facilité de culture en PBR.

II.3. Validation des performances en croissance des souches dans des conditions de culture optimales et défavorables

Dans cette étude, les performances de croissance se traduisent par la capacité des souches à produire de la biomasse en conditions de culture normales et défavorables (influence des paramètres physiques et biochimiques).

II.3.1. Paramètres physiques

II.3.1.1. Intensité lumineuse et photopériodes

La croissance de nos trois souches a été examinée pour deux flux incidents ($q_0 = 50$ et $100 \mu\text{mol}$ de photons. $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) et quatre photopériodes différentes (24h/0h, 18h/6h, 12h/12h, 6h/18h jour/nuit), en ajustant tous les paramètres de culture et en dehors de toute limitation minérale, la lumière reste le facteur limitant du procédé afin de mettre en évidence son influence sur l'évolution de la croissance photosynthétique des souches.

La composition biochimique en régime stationnaire a été déterminée sous chacune des conditions lumineuses appliquées à savoir : le pourcentage en lipides, le pourcentage en protéines, le pourcentage en carbohydrates et celui des pigments (chlorophylle a, chlorophylle b ainsi que les caroténoïdes).

II.3.1.2. Température

Afin d'étudier l'impact de la température sur le taux de croissance ainsi que la composition biochimique des souches étudiées les expériences ont été effectuées sous trois températures distinctes ; les valeurs de température testées varient de 20 à 30°C avec un intervalle de cinq degrés. Toutes les expériences ont été réalisées sous la même intensité lumineuse ($q_0=100 \mu\text{mol}$ de photons. $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), une salinité de 30 PSU, pH 8 et ceci durant 12 jours.

II.3.1.3. Potentiel hydrogène (pH)

Quatre différents pH initiaux (10, 8, 6 et 4) ont été testés dans le but d'évaluer leur impact sur le taux de croissance ainsi que la composition biochimique des souches étudiées. Durant toutes les expériences (12 jours) la température est maintenue constante à $23 \pm 1^\circ\text{C}$, une salinité de 30PSU et une intensité lumineuse incidente de $q_0 = 100 \mu\text{mol}$ de photons. $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

II.3.1.4. Salinité

Ce paramètre est étudié dans le but d'évaluer la tolérance de la microalgue marine *Nannochloropsis gaditana* à la salinité, les valeurs varient de 15 à 75 PSU avec un intervalle de 15 PSU soit par l'ajout de *NaCl* ou par dilution avec de l'eau distillée ; les autres paramètres sont maintenus constants.

II.3.1.5. Surface spécifique éclairée

Chaque PBR est caractérisé par sa surface spécifique éclairée notée "*as*" exprimée en m^{-1} (m^2/m^3), dépendante de la géométrie du PBR. Ce paramètre relie deux notions essentielles, à savoir la surface éclairée qui est liée donc à l'apport d'énergie lumineuse à la culture, et le volume de culture dans lequel cette lumière s'atténue, dans le cas des systèmes plats, la

surface spécifique éclairée sera inversement proportionnelle à l'épaisseur de la culture (L), comme donné par l'équation 9.

$$as = \frac{1}{L} \quad (9)$$

De même, pour les systèmes de géométries cylindriques et éclairés d'un seul côté, cette grandeur sera inversement proportionnelle au rayon du cylindre, comme exprimée dans l'équation 10.

$$as = \frac{2}{D} \quad (10)$$

Au cours de cette expérience nous avons étudié l'effet de différents systèmes de culture (une multitude de miniphotobioréacteur à différentes surfaces spécifiques éclairées (0,2 ; 0,153 ; 0,125 et 0,1 m^{-1})).

II.3.1.6. Elaboration d'un système de culture de type plat à l'échelle pilote

Considérant l'impact de plus en plus fort des biotechnologies microalgales, il s'est révélé intéressant de travailler sur la conception d'un système de culture, ce qui représente un défi scientifique très complexe. En effet, ce système biologique interagit avec de nombreux facteurs physiques et biologiques. Divers modèles de complexité variable ont été proposés dans la littérature afin de caractériser le comportement cellulaire des microalgues dans les systèmes de culture.

Le modèle de croissance retenu dans le cadre de la présente thèse est un système de culture de type plat dont les avantages résident dans un ratio surface sur volume important, un faible chemin lumineux, et une bonne qualité de transfert gazeux.

- **Description du système de culture**

Ce travail comprend une enceinte de culture plate présentant un volume utile de 12,5 litres. Le corps est construit en verre transparent avec un rapport surface par volume égal à 0,2 m^2/m^3 , une largeur et hauteur de 50 cm et 5 cm d'épaisseur comprenant un couvercle muni de plusieurs orifices, et une partie dite intermédiaire qui présente une sortie (une vanne qui permet la prise de l'échantillon durant la culture).

La température au sein du réacteur est maintenue à une valeur égale à $23 \pm 1^\circ C$, l'agitation de la culture est assurée par un bullage d'air contenant du CO_2 atmosphérique injecté en continu par la partie supérieure du réacteur. Au préalable, ce débit gazeux est stérilisé par l'utilisation d'un filtre stérilisant Millipore (0,22 μm) et régulé par une vanne de régulation intégrée.

Le flux de photons est délivré par cinq néons de type *LED* (Osram Dulux 55 W) placés à 5 cm du dispositif expérimental assurant un spectre lumineux similaire à la lumière solaire adéquate pour la croissance et l'activité photosynthétique des microalgues (figure 25).

L'intensité lumineuse reçue au centre du photobioréacteur dépend de l'intensité de la source, de la disposition géométrique par rapport à la source, et de l'auto-ombrage induit par le développement de la culture elle-même. L'intensité lumineuse est mesurée en continu au centre du photobioréacteur et à l'extérieur par un luxmètre.

Un réflecteur de lumière en aluminium a été placé sur toute la hauteur du système afin de concentrer la lumière incidente et d'améliorer la disponibilité de l'énergie lumineuse au niveau de la culture.

Au niveau de la partie supérieure, ce système est équipé de trois entrées, utilisées pour introduire le bullage d'air ainsi que l'électrode de pH, au niveau de l'une des entrées un filtre Millipore de 0,22 µm est rajouté afin d'assurer un dégagement gazeux.

Cette enceinte est soulevée par une structure métallique de deux mètres de hauteur et de largeur, munie de quatre roues facilitant le déplacement.

Bien que nous ne visons pas à l'axénicité totale des cultures, un maximum de précautions est pris dès le montage et pendant toute la durée de l'expérience afin d'éviter le développement de micro-organismes autres que nos souches.

Lors du montage, l'enceinte est lavée à l'acide puis à l'éthanol avant d'être rincées par le milieu de culture préalablement autoclavé et filtré. Toute la tubulure servant ensuite au transport des fluides est également stérilisée. Le tableau 9 présente les différents prélèvements réalisés lors des différentes études menées.



Figure 25 : Photos représentative du système de culture de type plat (AQUABIOR, 2017)

II.3.2. Paramètres biochimiques (Optimisation du milieu F/2Guillard)

II.3.2.1. Concentration en bicarbonate de sodium

Pour cette expérience le bicarbonate de sodium $NaHCO_3$ est utilisé comme seule source de carbone (source de carbone minéral) à une concentration de 23,81 ; 11,9 ; 5,95 et 0 mM, le milieu de culture ne contenant pas de source de carbone représente le témoin (contrôle).

II.3.2.2. Source et concentration initiale d'azote

Cette partie expérimentale a été divisée en deux sections, à savoir la sélection de la source d'azote ayant permis la meilleure croissance et l'analyse de l'effet de sa concentration.

Au cours de cette expérience la source d'azote ($NaNO_3$) constitutive du milieu de culture F/2 Guillard est substituer par différentes sources d'azote organique et inorganique à savoir (NH_4Cl , NH_4OH , $NaNO_3$, CH_4N_2O et un mélange de toutes ces sources) à concentration égale d'azote (8,82 mM (123,5 mg N/l)), ce qui équivaut à 0,472 g/l de NH_4Cl , 53,1 cm³ de

NH_4OH et 0,265 g/l d'urée. L'expérience se déroule à 23 ± 1 °C, pH 8, une salinité de 30 PSU et une photopériode de 18h/6h à 100 μmol de photons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ pendant 12 jours.

La source permettant d'obtenir la meilleure croissance a été testée par la suite à différentes concentrations d'azote (17,64 ; 8,82 ; 6,61 ; 4,41 et 2,20 mM) sous les mêmes conditions de culture.

II.3.2.3. Concentration en phosphate

Na_2HPO_4 représente l'unique source de phosphate constitutif du milieu de culture F/2 Guillard ; cette dernière est étudiée à différentes concentrations (0,363 ; 0,363 ; 0,271 ; 0,181 et 0,09 mM). La concentration en phosphate reste le seul facteur variable du procédé afin de mettre en évidence son influence sur l'évolution de la croissance et la composition biochimique de la cellule microalgale.

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des paramètres physiques et biochimiques étudié

	Paramètre étudié	Valeurs testé (variable)	Paramètre constant
Paramètres physiques	Intensité lumineuse et photopériodes (Lumière/obscurité)	Flux incidents ($q_0 = 50$ et 100 μmol de photons. $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) Photopériodes : (24h/0h) - (18h/6h) - (12h/12h) - (6h/18h)	Température (23 ± 1 °C) pH (8) Salinité* (30 PSU)
	Température	Température variant de 20 à 30 °C avec un intervalle de 5°C.	Photopériode de 18h/6h à 100 μmol de photons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ pH (8) Salinité* (30 PSU)
	pH	pH initiaux (10, 8, 6, 4)	Photopériode de 18h/6h à 100 μmol de photons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Température (23 ± 1 °C) Salinité* (30 PSU)
	Salinité*	Salinité variant de 15 à 75 PSU avec un intervalle de 15 PSU	Photopériode de 18h/6h à 100 μmol de photons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ pH (8) Température (23 ± 1 °C) Salinité* (30 PSU)
Paramètres biochimiques	Source d'azote	Substitution du $NaNO_3$ par du : NH_4Cl - NH_4OH - $NaNO_3$ - CH_4N_2O Ainsi qu'un mélange de toutes ces sources	Photopériode de 18h/6h à 100 μmol de photons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ pH (8) Température (23 ± 1 °C) Salinité* (30 PSU)
	Différentes concentrations d'azote	Différentes concentrations de la source permettant d'obtenir la meilleure croissance 17,64 ; 8,82 ; 6,61 ; 4,41 et 2,20 mM	Photopériode de 18h/6h à 100 μmol de photons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ pH (8) Température (23 ± 1 °C) Salinité* (30 PSU)
	Différentes concentrations en phosphate	Différentes concentrations de Na_2HPO_4 0,363 ; 0,363 ; 0,271 ; 0,181 et 0,09 mM	Photopériode de 18h/6h à 100 μmol de photons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ pH (8) Température (23 ± 1 °C) Salinité* (30 PSU)
	Différentes concentrations en carbone	Différentes concentrations de $NaHCO_3$ 23,81 ; 11,9 ; 5,95 et 0 mM	Photopériode de 18h/6h à 100 μmol de photons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ pH (8) Température (23 ± 1 °C) Salinité* (30 PSU)

Salinité*: Paramètre étudié pour la souche marine

Tableau 9 : Fréquence des prélèvements pour chaque analyse

Culture en batch	
Prélèvements et mesures quotidiennes	○ Comptage cellulaire
	○ Lumière
	○ Température
Phase stationnaire	
Prélèvements ponctuels	○ Lipides totaux
	○ Carbohydrates
	○ Protéines
	○ Pigments

II.4. Potentialités des effluents de piscicultures intensives à produire des microalgues en masse

72% de l'azote et 70% du phosphore contenus dans l'aliment utilisé pour l'élevage de poissons sont rejetés dans l'environnement (Hussenot, 2004). Pour exemple, une production de 100 tonnes de saumon atlantique entraîne un rejet dans l'environnement de 3,5 tonnes d'azote et de 700 kg de phosphore (Chopin *et al.*, 2001).

Il apparaît donc intéressant d'en tirer profit et notamment de rechercher à utiliser et valoriser cet enrichissement en nutriments (*N* et *P*), de façon à orienter la production végétale vers des microalgues particulières, qui auront un double rôle :

- Traiter les eaux enrichies des élevages ;
- Servir de biomasse pour différente application.

C'est dans ce contexte que nous avons testé l'effet d'un milieu effluent de pisciculture (élevage du *tilapia O. niloticus*) sur la croissance de nos trois souches de microalgues.

II.4.1. Matériel biologique

Cette étude expérimentale a été effectuée sur un élevage du *tilapia O. niloticus* considéré comme étant l'un des poissons les plus largement cultivés dans le monde, en effet le tilapia élevé représente plus de 75% de la production de tilapia du monde (F.A.O, 2009). Les individus du *tilapia O. niloticus* utilisés au cours de ce travail ont été obtenus auprès du laboratoire d'Aquaculture et de Bioremédiation (AQUABIOR).

Un total de 35 poissons dont le poids varie de 50 à 112 g a été utilisé pour la réalisation de cette expérience. Les poissons ont été soumis à une période d'acclimatation d'une semaine avant le début de l'expérience, où ils ont été nourris avec un régime référentiel (Benzidane, 2011).

II.4.2. Infrastructure d'élevage

L'expérience a été réalisée dans un aquarium d'une contenance utile de 100 litres (système fermé). Un système de filtration, constitué d'un filtre mécanique (Eheim 250) et d'un filtre biologique est utilisé.

II.4.3. Paramètres physico-chimiques

Les paramètres de la qualité de l'eau étaient contrôlés régulièrement de manière à assurer les conditions optimales d'élevage pour le tilapia. La température et la concentration en oxygène dissous étaient suivies tous les jours.

L'eau est maintenue à une température constante de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, grâce à des résistances de type thermoplongeantes et vérifiée à l'aide d'un thermomètre à mercure.

L'aération a été assurée au niveau de l'aquarium grâce à un oxygénateur (Resun : AC-4000, 12 l/min). La teneur en oxygène dissous est maintenue à un minimum de 5 ppm. Cette dernière est vérifiée à l'aide d'un oxymètre (Hanna 1945).

II.4.4. Ration alimentaire et fréquence de nourrissage

Selon les études réalisées par Lazard (2007), la ration alimentaire optimale quotidienne est plus élevée pour les poissons de 2-10 g (environ 11% de la biomasse), plus faible pour les juvéniles de 30-35 g (autour de 3% de la biomasse), et nettement plus faible pour les adultes de 100-200 g (proche de 1,5%).

Sur la base de ces recommandations, l'apport alimentaire journalier a été fixé à 2%. L'aliment (tableau 9) était distribué quotidiennement 3 fois par jour (9h, 12h et 15h).

Tableau 10 : Tableau représentatif des constituants majeurs de l'aliment des poissons

Constituants analytiques (%)		Additifs (vitamine) UI/kg		Oligoéléments mg/kg	
Protéine brute	45%	Vitamine A	10000	Cu	1
Matière grasse	17%	Vitamine D3	500	Mn	8
Cendres brutes	3,1%			Zn	50
Phosphore	1%			I	1,2
Calcium	1,22%				
Sodium	0,33%				

Les prélèvements des milieux étudiés sont effectués tous les 3 jours et ceux-ci durant 12 jours, puis filtré et stérilisé avant d'être utilisé comme milieu de culture pour nos trois souches de microalgues, la composition de ces effluents est analysée en mesurant : le pH, la demande chimique en oxygène, la conductivité, la teneur en nitrite et nitrate ainsi que celle des orthophosphat et phosphate.

Plusieurs supplémentations en minéraux et vitamine dans les mêmes proportions que ceux du milieu F/2 Guillard en été effectuer a fin d'évité toute limitation (NaNO_3 , NaHPO_4 , Métaux trace, vitamine).

Le taux de croissance des souches de microalgues étudiée est mesuré après 7 jours de culture, à la fin de cette période expérimentale les différents composants biochimiques sont dosés (protéines, carbohydrates et pigments) dans le but d'effectuer une caractérisation biochimique des souches et de validé l'utilisation de ses milieux non conventionnelle.

II.5. Protocoles d'analyse et détermination des grandeurs des souches

II.5.1. Récolte de la biomasse et lyophilisation

La récupération de la biomasse microalgale est réalisée en début de la phase stationnaire par centrifugation.

Principe : La biomasse microalgale est récoltée suite à une centrifugation à 8500 tr/min pendant 5 min à 20°C . Cette technique de concentration utilise la force centripète afin de permettre la séparation des microalgues avec le milieu de culture par simple différence de densité. Selon Park et *al.* (2011), la centrifugation est efficace à 90% et le taux de récupération est directement lié au débit fixé en amont. Cette méthode est rapide et efficace, et représente une des méthodes les plus utilisées à l'échelle industrielle.

Les échantillons sont ensuite congelés à -80°C afin de cristalliser l'eau le plus finement possible, protégeant ainsi les parois cellulaires des risques d'éventuelles perforations. Les biomasses sont finalement lyophilisées puis conservées à 4°C (Rawat et al., 2011).

II.5.2. Dénombrement cellulaire

La concentration en nombre de cellules présente dans la suspension microalgale est déterminée pour toutes les souches au microscope optique (Labscope LW200) (objectif 40) par comptage sur hématimètre de type Malassez (annexe III).

II.5.3. Estimation du taux de croissance et du temps de génération

C'est le taux de changement de la biomasse par unité de temps et par unité de biomasse. Sa dimension est donc « T^{-1} ».

Le taux de croissance est calculé entre deux valeurs différentes de concentration cellulaire n_1 et n_2 , selon la formule utilisée par Mohanadoss (2013) :

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{n_2}{n_1}\right)}{t_2 - t_1} \quad (11)$$

$$G = \frac{1}{\mu} \quad (12)$$

Avec : μ : le taux de croissance instantané
 n_1 : la biomasse au temps t_1
 n_2 : la biomasse au temps $t_2 > t_1$
 G : le temps de génération.

II.5.4. Dosage des protéines (Méthode de Bradford)

L'extraction alcaline des protéines a été réalisée à 80°C par ajout de 1 ml de NaOH (0,5 N) au culot à 3 reprises pendant 10 mn (Chen, 2013). Le surnageant est récupéré par la suite afin d'effectuer notre dosage suivant la méthode de Bradford.

La méthode de Bradford (1976) est un dosage colorimétrique, basé sur le changement de couleur du bleu de Coomassie lorsqu'il s'associe avec les acides aminés basiques, (arginine, histidine, lysine) et les acides aminés hydrophobes présents dans les protéines. Les formes cationiques (libres) du colorant sont rouge-marron et la forme anionique du réactif correspond à la forme liée avec les protéines. L'absorbance de ce complexe est mesurée à 595 nm et est proportionnelle à la quantité de protéines dans l'échantillon.

Une gamme étalon comprise entre 0 et 1 mg/ml est réalisée avec une solution mère de sérum albumine bovine (SAB) à 1 mg/ml.

Le réactif de Bradford (BIO-RAD) (annexe V) est dilué au $1/5^{\text{ème}}$, avec de l'eau milli Q stérile, agité puis filtré sur filtre plissé. Le réactif dilué est stocké à l'obscurité à 4°C où il se conserve 3 semaines. 100 μl d'échantillon sont mélangés avec 5 ml du réactif de Bradford. La solution est incubée 30 min à l'obscurité à température ambiante puis l'absorbance est lue à 595 nm (Spectrophotomètre UV-Visible Lambda 35).

II.5.5. Dosage des carbohydrates

Les carbohydrates cellulaires ont été estimés après extraction alcaline chaude (Chneegurt, 1994), en résumé, les culots (obtenus à partir de 1,5 ml de culture) ont été remis en suspension dans 0,2 ml d' H_2O puis chauffés dans 0,4 ml de KOH à 40% (p/v) à 90°C

pendant 1 h. Après refroidissement, 1,2 ml d'éthanol absolu froid a été ajouté et stocké à -20°C, les surnageants ont été rejetés suite à une centrifugation et les culots remis en suspension dans 1,5 ml de H_2O (Chen, 2013).

Les sucres totaux sont déterminés par colorimétrie à 484 nm par la méthode de Dubois et al. (1956). L'hydrolyse des polysaccharides en monosaccharides est réalisée en présence d'acide sulfurique fumant (98%). Les monosaccharides obtenus sont déshydratés puis réarrangés pour former du furfural à partir des pentoses ou hydroxyméthylfurfural à partir des hexoses. Ces composés conduisent à une coloration jaune caractéristique par condensation avec le phénol.

Une gamme étalon de glucose a été préalablement préparée de 0 à 300 mg/l. La coloration jaune obtenue a été lue au spectrophotomètre à 484 nm et les concentrations en glucides des échantillons ont été déduites en comparaison avec la gamme étalon de glucose (annexe IV).

II.5.6. Détermination de la concentration et de la composition des pigments

Le contenu en pigments est déterminé par une méthode spectrophotométrique. Ainsi, un volume noté V_1 de la culture est centrifugé pendant 10 minutes à 12000 rpm. Le surnageant est éliminé par la suite et le culot mis en suspension dans un volume V_2 convenable de méthanol (99,8%) pendant une durée comprise entre 30 minutes et 3 heures, à 44°C et à l'obscurité. Par la suite, les débris cellulaires sont précipités et séparés par centrifugation pendant 5 minutes à 12000 rpm ; la couleur blanche du culot est un moyen de vérifier que l'extraction est complète. L'absorbance du surnageant est mesurée à différentes longueurs d'ondes (480, 652, 665 et 750 nm). La mesure de la densité optique à 750 nm (inférieure à 0,01) permet de vérifier l'absence de turbidité (débris cellulaires restants, bactéries, etc.) (Taleb, 2015).

Trois répliques sont préparés. Les valeurs moyennes de ces absorbances notées A_{480} , A_{652} et A_{665} sont finalement utilisées pour calculer les concentrations de la chlorophylle a , la chlorophylle b et les caroténoïdes via les équations de (Ritchie, 2006) pour les chlorophylles et de (Pancha et al., 2015) pour les caroténoïdes :

$$[Chl_a](\mu g/ml) = [-8,0962 \times A_{652} + 16,5169 \times A_{665}] \times \frac{V_2}{l \cdot V_1} \quad (13)$$

$$[Chl_b](\mu g/ml) = [27,4405 \times A_{652} - 12,1688 \times A_{665}] \times \frac{V_2}{l \cdot V_1} \quad (14)$$

$$[C](\mu g/ml) = \frac{[1000 \times A_{480} - 1,63 \times Chl a - 1104,9 \times Chl b]}{221} \quad (15)$$

La microalgue *Nannochloropsis gaditana* ne possédant pas de chlorophylle b , les équations de détermination des concentrations en pigments sont les suivantes (Artu., 2016) :

$$[Chl_a](\mu g/ml) = [13,9 \times A_{665}] \times \frac{V_2}{l \cdot V_1} \quad (16)$$

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

Connaissant la concentration massique de la culture, la teneur en pigments en gramme de pigments par gramme de biomasse sèche peut être calculée.

II.5.7. Extraction des lipides totaux

Un protocole d'extraction a été décrit par Zhu et *al.* (2002). Il s'agit d'une modification de la méthode d'extraction par voie humide Bligh and Dyer (1959) : Les cellules ont été récoltées par centrifugation à 8500 tr/min pendant 5 min et lavées une fois avec de l'eau distillée. Après séchage, les échantillons ont été broyés dans un mortier et extrait par un mélange de chloroforme : méthanol (2 :1, v/v). Après agitation de l'échantillon en utilisant un agitateur magnétique, les échantillons ont été centrifugés à 3000 tr/min pendant 10 min.

La phase solide a été séparée avec soin en utilisant un papier filtre dans lequel deux morceaux de papiers filtres ont été appliqués à deux reprises pour fournir une séparation complète. La phase solvant est évaporée dans un évaporateur rotatif (Rotary evaporator HS-2005V) sous vide à 60°C. La procédure a été répétée deux fois jusqu'à ce que la totalité des lipides soit extraite.

II.6. Analyse statistique

Dans tous les cas les statistiques descriptives (moyenne \pm écart type) sont utilisées pour décrire l'ensemble des résultats. Avant toute analyse statistique, nous avons vérifié l'homogénéité des variances. Lorsque les variances sont homogènes, l'analyse statistique consiste en un test paramétrique d'ANOVA 1. Lorsque les variances ne sont pas homogènes, le test statistique consiste en un test non paramétrique de Kruskal-Wallis.

Pour déterminer si les différences entre les moyennes obtenues sont significatives, nous utilisons le test de Tukey (HSD) dans le cas de l'ANOVA 1 et celui de Mann-Witney dans le cas de Kruskal-Wallis. Les valeurs de ($p < 0,05$) ont été considérées comme statistiquement significatives.

Chapitre III – Résultats

III.1. Description morphologique des taxons observés au niveau de l'estuaire de l'Oued Chélif

III.1.1. Caractères principaux des genres de microalgues observées

Les résultats consignés dans le tableau 11 ont été obtenus grâce à l'étude morphologique des genres de microalgues rencontrés au niveau des deux sites d'échantillonnage (figure 26).

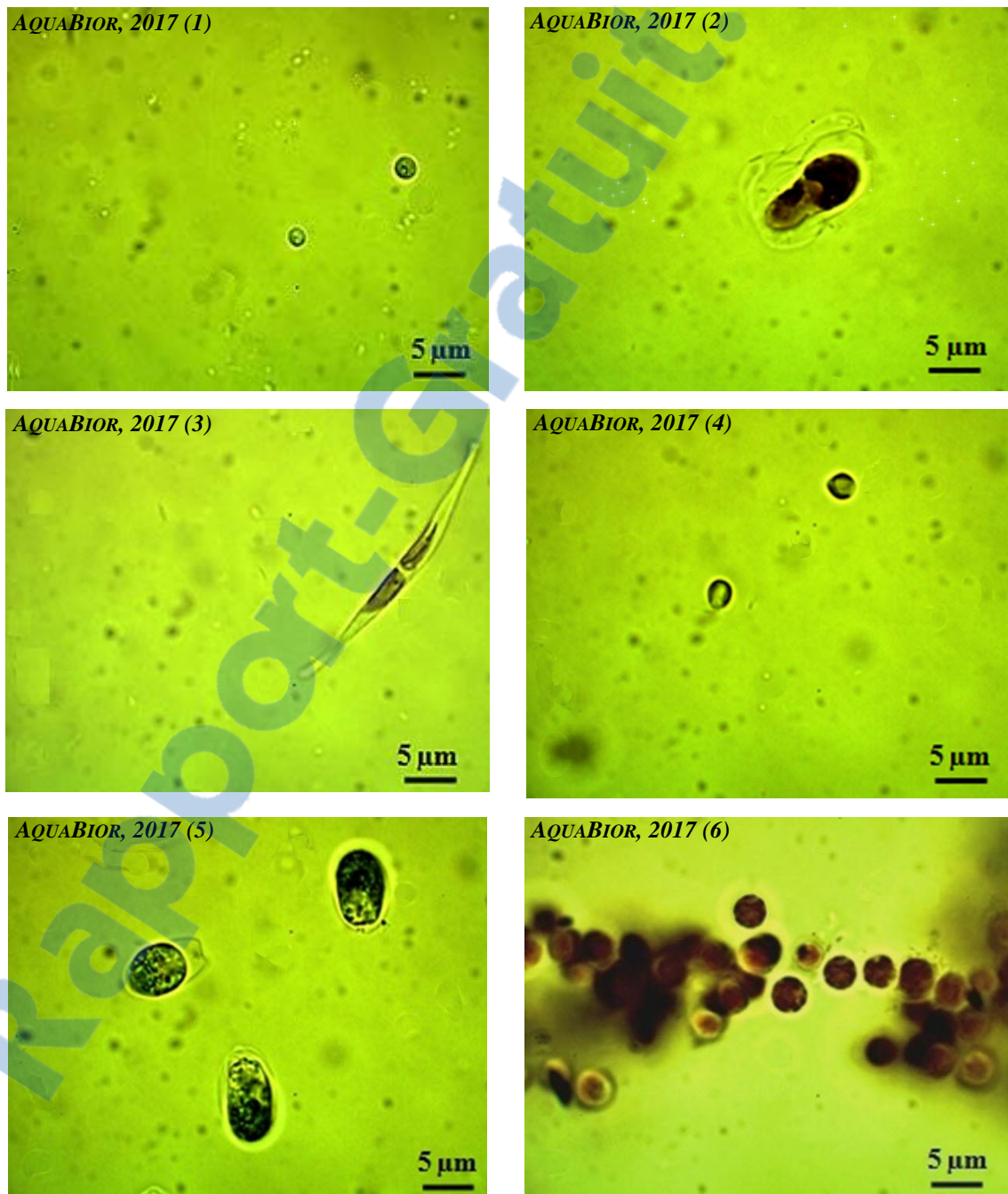


Figure 26: Observation microscopique (microscope optique $\times 100$) des souches rencontrées au niveau de l'estuaire de l'Oued Chélif (stations S1 de 1 à 9, stations S2 : 9 et 11) (AQUABIOR, 2017).

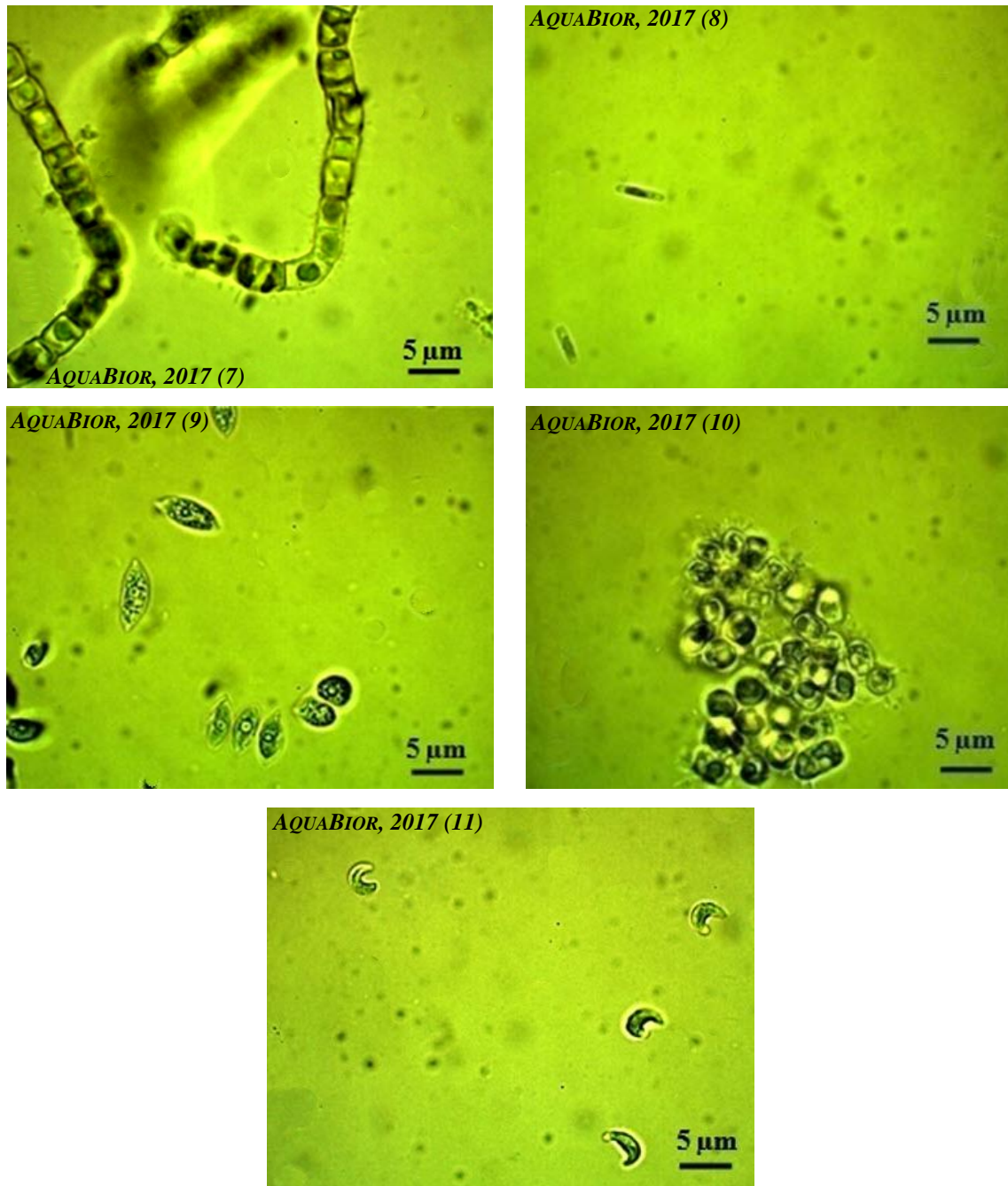


Figure 26 (Suite): Observation microscopique (microscope optique $\times 100$) °des souches rencontrées au niveau de l'estuaire de l'Oued Chélif (stations S1de 1 à 9, stations S2 : 9 et 11) (AQUABIOR, 2017).

Tableau 11 : Caractères principaux des microalgues observées

Genre	Thalle	Cellule		Taille	La classe	Gelée
		Agencement	Forme			
<i>Nannochloropsis sp.</i> (1)	Unicellulaire	Solitaires	Non mobiles, sphériques à ovoïdes	2 à 3 µm	<i>Eustigmatophyceae</i>	Absente
<i>Entomoneis Sp.</i> (2)	Unicellulaire	Solitaires	Tordues autour de l'axe apical (frustules torsadées)	15 à 20 µm	<i>Bacillariophyceae</i>	Absente
<i>Cylindrotecha Sp.</i> (3)	Unicellulaire	Solitaires	Fusiforme non tordues longues et étroites, en forme d'aiguilles	20 à 25 µm	<i>Bacillariophyceae</i>	Absente
<i>Tetraselmis Sp.</i> (4)	Unicellulaire	Solitaire, nage libre, cellules de thécate.	Rondes, ovoïdes, elliptiques, aplaties, comprimées Mobile grâce à 4 flagelles	3 à 5 µm	<i>Chlorophyceae</i>	Absente
<i>Dunaliella Sp.</i> (5)	Unicellulaire	Solitaires,	Mobiles par deux flagelles de longueur égale, de forme allongée à ovoïde	9 à 11 µm	<i>Chlorophyceae</i>	Absente
<i>Porphyridium sp</i> (6).	Unicellulaire	Solitaires, mais souvent groupés en colonies irrégulières	Sphériques à ovoïdes	2,5 à 4 µm	<i>Rhodophycée</i>	Une matrice mucilagineuse mal définie
<i>Staurosira Sp.</i> (7)	Pluricellulaire	Chaînette	Ovale, elliptique, cruciforme ou triangulaire	2 à 4 µm	<i>Bacillariophyceae</i>	Absente
<i>Espèce non identifiée</i> (8)	Unicellulaire	Solitaires	Bâtonnet arrondie à l'extrémité	3 à 5 µm	<i>Bacillariophyceae</i>	Absente
<i>Scenedesmus Sp.</i> (9)	Pluricellulaire	Cénobe plat ou un peu arqué, linéaire ou en 2series alternantes.	Cylindrique, fusiforme, ovoïde, ellipsoïdale	2,5 à 5 µm	<i>Chlorophyceae</i>	Absente
<i>Planothidium sp.</i> (10)	Unicellulaire	Solitaires	Sommets parfois étirés ou largement capitalisés Légèrement incurvées	4 à 8 µm	<i>Bacillariophyceae</i>	Absente
<i>Tetranephris brasiliensis</i> (11)	Unicellulaire	Solitaires, alvéoles grappes pendant la division cellulaire	Hélicoïdale, semi-circulaire incurvée	2 à 5 µm	<i>Chlorophyceae</i>	Absente



III.1.2. Identification morphologique des souches étudiées par observation au microscope électronique à balayage (MEB)

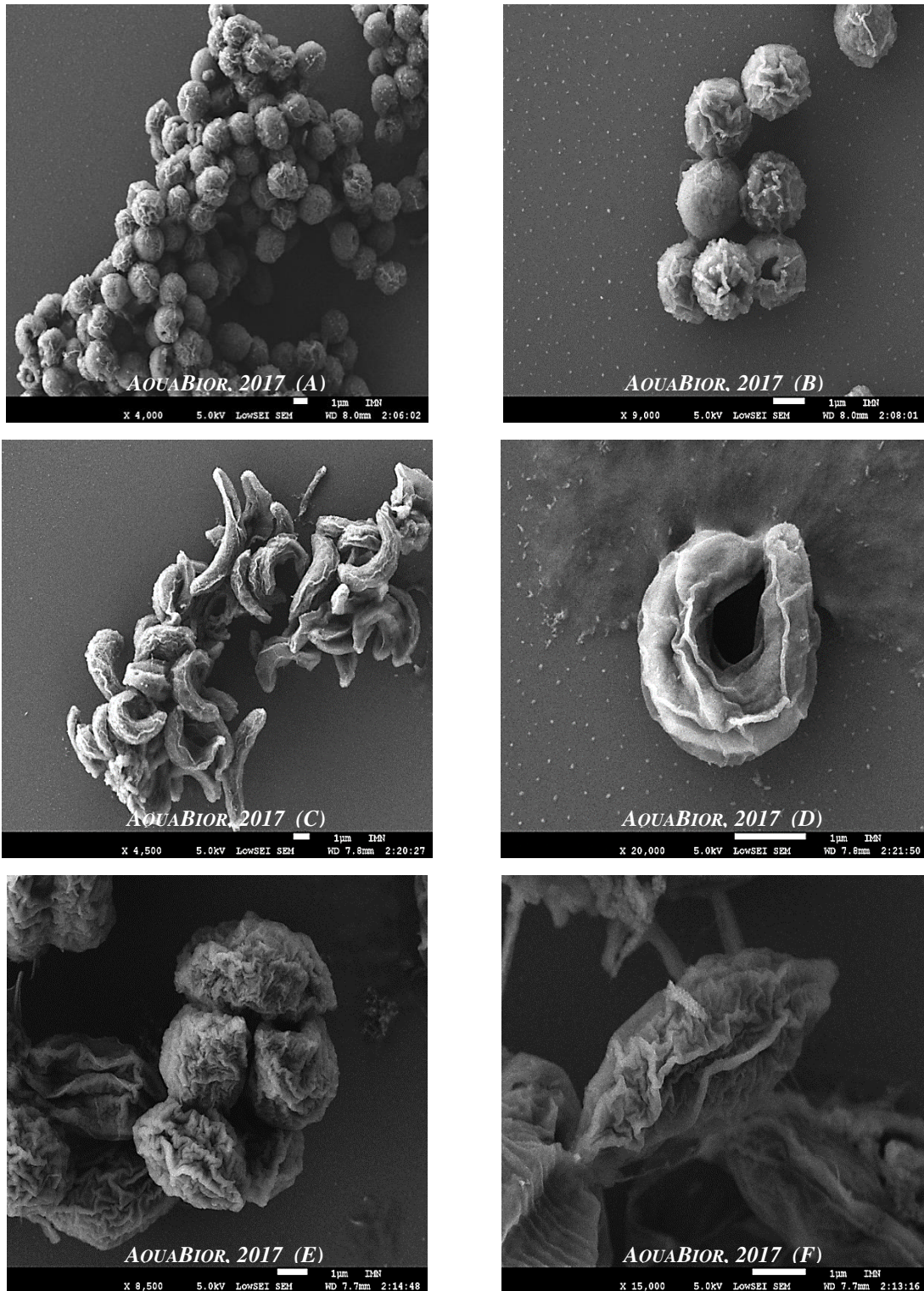


Figure 27 : Photos des souches étudiées prises après observation au microscope électronique à balayage (*Nannochloropsis gaditana* (A ($\times 4000$) - B ($\times 9000$)), *Tetranephris brasiliensis* (C ($\times 4500$) - D ($\times 20000$)), *Scenedesmus sp.* (E ($\times 8500$) - F ($\times 15000$)))

L'observation au microscope électronique à balayage (MEB) nous a permis d'obtenir des images de haute résolution de la surface des différentes souches de microalgues isolées et étudiées (figure 27).

- *Nannochloropsis gaditana*

Les cellules se caractérisent par une forme sphérique et un diamètre qui se situe entre 1,7 et 2,1 μm comme illustré dans la figure 27 (A), cette microalgue est non motile, n'exprimant pas de caractéristiques morphologiques distinctes, et ne peut être donc distinguée par la microscopie optique ou électronique.

- *Tetranephris brasiliensis*

Les cellules sont en forme de rein (corne ou haricot) avec les deux pôles arrondis, Le cénobium de *Tetranephris brasiliensis* est généralement formé par quatre cellules disposées de manière cruciale rayonnant d'un centre commun, leur longueur varie entre 4 et 5.8 μm et la largeur de 6 à 8.6 μm (figure 27 (C)).

- *Scenedesmus sp.*

Les cellules non motiles sont couramment organisées en forme de cénobies avec un nombre fixe de cellules dans une colonie : des multiples de deux, de quatre ou de huit cellules disposées obliquement en séries distinctes (figure 27 (E)). Ces dernières sont fusiformes, égales, un peu ventrues au milieu, aiguës à l'extrémité libre et subaiguës ou arrondies à l'intérieur formant environ des cellules elliptiques de 5 μm de longueur et 3 μm de largeur.

III.1.3. Identification des souches étudiées par techniques de biologie moléculaire

Les souches de microalgues faisant l'objet de cette étude expérimentale ont été identifiées par les techniques de biologie moléculaire (séquençage du gène codant pour l'ARN 18S), l'ADN a été extrait de culture en phase de croissance, puis amplifié par PCR à l'aide des primers NS51 et NS61. Après amplification et électrophorèse sur gel d'agarose en présence d'un standard, un fragment d'environ 500-pb a été identifié (figure 28).

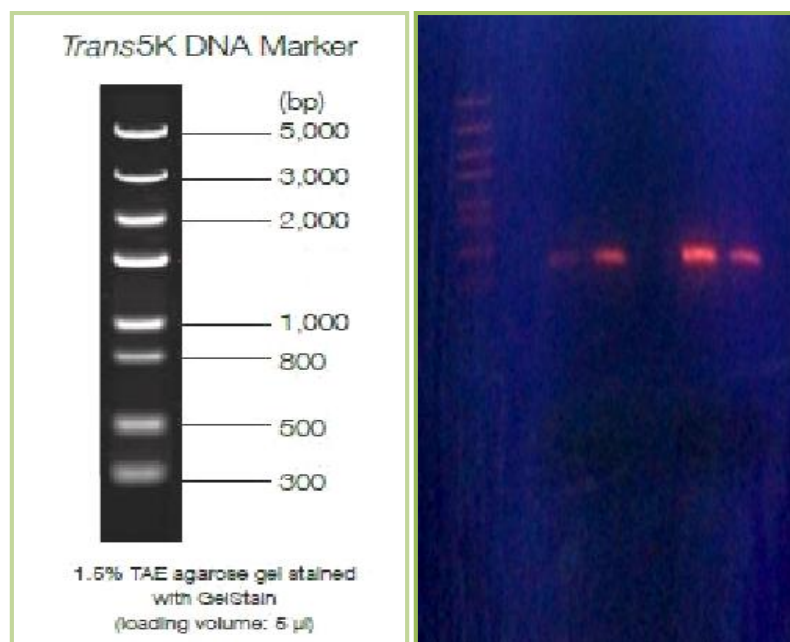


Figure 28 : Migration du fragment d'ADN codant pour l'ARNr 18S des deux souches étudiées avec une échelle de poids moléculaire (*Trans 5K DNA marker*)

La comparaison des séquences d'ADN codant pour l'ARNr 18S présentes sur le site NCBI avec celles obtenues pour les microalgues étudiées au cours de ce travail de thèse a donc permis leur identification comme étant deux chlorophycées appartenant à la famille des Scenedesmaceae à savoir *Tetranephris brasiliensis* et *Scenedesmus* sp. (figure 29).

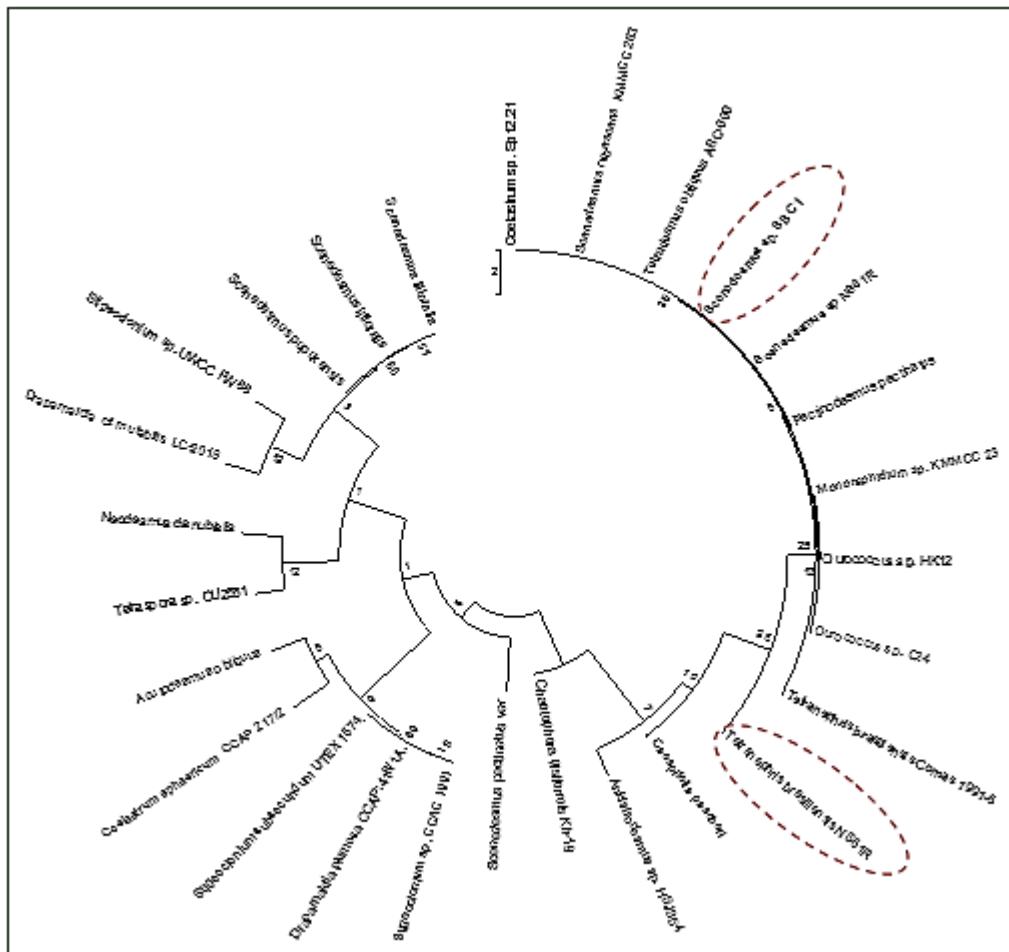


Figure 29 : Arbre phylogénétique déduit de la comparaison des séquences des gènes codants pour les ARNr 18S des microalgues par la méthode Neighbor-Joining en utilisant le programme MEGA 6

III.1.4.Évaluation de la facilité de culture des souches (Caractérisation qualitative et quantitative de la croissance en conditions optimales des souches cultivées en miniphotobioreacteur)

Les courbes de croissance de la souche marine et des souches d'eau douce sont illustrées dans la figure 30. Toutes les souches ont montré une phase de latence relativement courte (2 jours au maximum), se qui révèle leur facilité d'adaptation aux conditions de culture.

Par ailleurs, la formation de biofilms et la sédimentation des cellules ont été examinées, aucune formation de biofilms ou sédimentation n'a été observée pour les souches *Nannochloropsis gaditana* et *Tetranephris brasiliensis*, en revanche, une faible sédimentation a été obtenue en fin de la période expérimentale pour la souche *Scenedesmus* sp.. Ces premiers essais révèlent une différence dans le comportement de croissance des souches exposées aux mêmes conditions de culture et montre l'intérêt de prendre en compte ce critère de comportement général en culture dans la procédure de criblage et de sélection de souches.

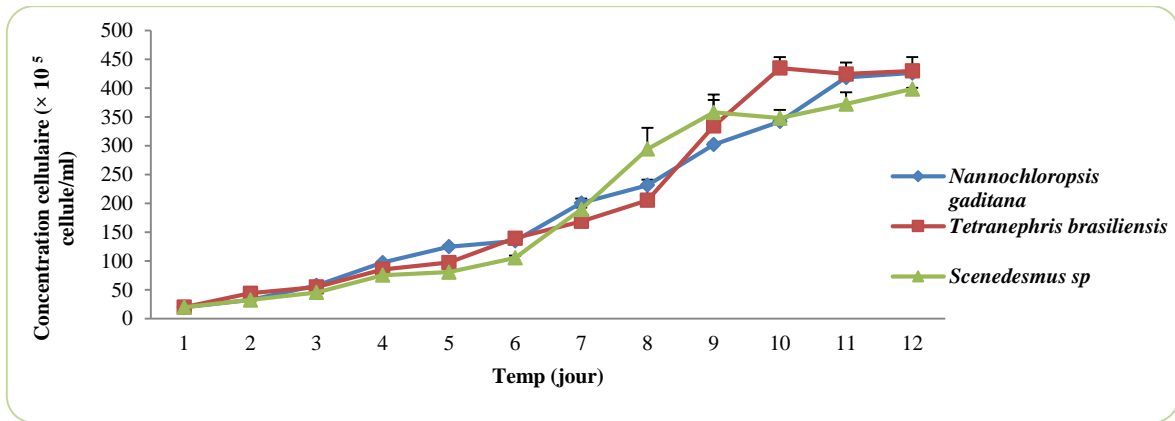


Figure 30 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire des trois souches de microalgues étudiées cultivées en condition de croissance normale (favorable) (n=3)

Tableau 12 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) des microalgues étudiées cultivées en condition de croissance normale (favorable) (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

	μ (J ⁻¹)	G (J)	BM ($\times 10^5$ cellule/ml)	MS (mg/l)
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	$0,315 \pm 0,001$ (a)	2,195	$379 \pm 12,48$	$1378,42 \pm 45,42$
<i>Tetranephris brasiliensis</i>	$0,342 \pm 0,003$ (b)	2,026	$425,66 \pm 19,62$	$482,28 \pm 21,73$
<i>Scenedesmus sp.</i>	$0,317 \pm 0,004$ (c)	2,186	$398,33 \pm 2,12$	$806,16 \pm 4,29$

La figure 31 présente les valeurs moyennes du biovolume cellulaire et de la surface pour 50 individus. La chlorophycée *Scenedesmus sp.* se caractérise par le plus grand biovolume cellulaire ($28,92 \mu\text{m}^3 \pm 17,85$) ($p \leq 0,05$), suivie par *T brasiliensis* et *N gaditana*. Néanmoins la plus grande surface est obtenue pour *N gaditana* ($p \leq 0,05$) avec une valeur de $41,83 \mu\text{m}^2 \pm 17,04$, en effet moins le biovolume cellulaire est important plus la surface est grande et vice versa.

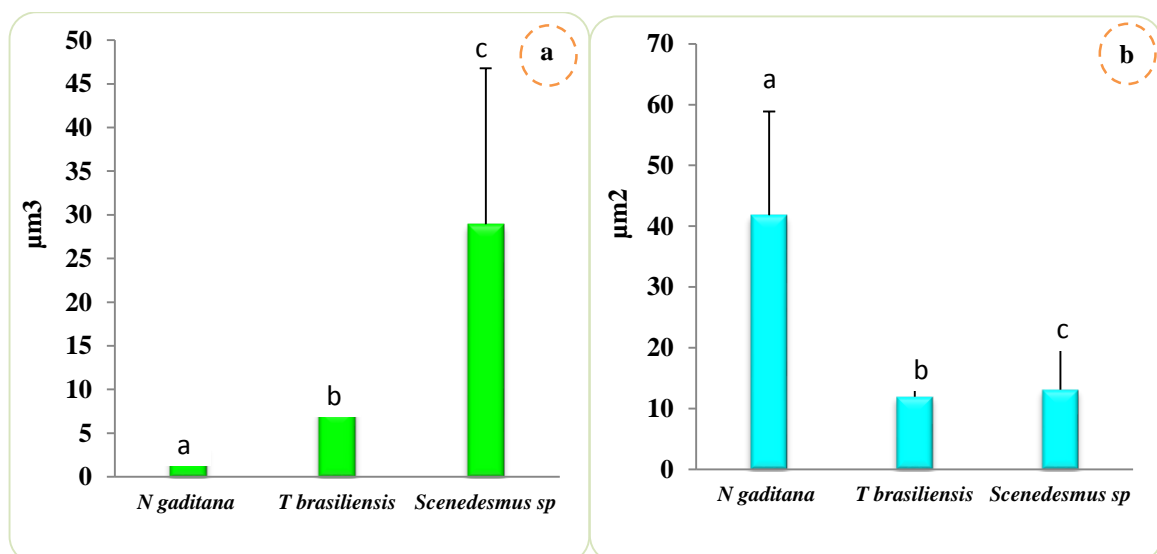


Figure 31 : Histogrammes représentatifs du biovolume cellulaire (a) ainsi que de la surface (b) des souches étudiées (n=50), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

III.2. Validation des performances en croissance des souches sous des conditions de culture optimales et défavorables

III.2.1. Paramètres physiques

III.2.1.1. *Nannochloropsis gaditana*

III.2.1.1.1. Influence des flux incidents et des différentes photopériodes sur la croissance cellulaire et la composition biochimique

L'analyse statistique de la variation du taux de croissance en fonction du flux incident et des différentes photopériodes (figure 32), montre un effet significatif ($p \leq 0,05$). Durant les trois premiers jours de chaque photopériode, la croissance cellulaire est stable (phase de latence) avec des valeurs moyennes de concentration cellulaire variant de 20 à $42,33 \times 10^5$ cellules/ml

Une évolution progressive et significative ($p \leq 0,05$) du nombre de cellules est observée sous toutes les photopériodes à $q_0 = 50$ et $100 \mu\text{mol}$ de photons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, la concentration maximale est atteinte au bout du 12^{ème} jour de culture et est estimée à $557 (\pm 54,28)$ millions cellules/ml sous 18h d'illumination à $100 \mu\text{mol}$ de photons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Par ailleurs, la concentration cellulaire des deux autres photopériodes (12h/12h et 06h/18h lumière/obscurité) reste maintenue dans un état de latence jusqu'à J₉. Leur concentration est maximale à J₁₂ avec une valeur de $122 (\pm 6,92)$ millions de cellules/ml pour une photopériode de 12h/12h sous $100 \mu\text{mol}$ de photons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, et une valeur de $60 (\pm 11,31)$ millions de cellules/ml sous 06h d'illumination.

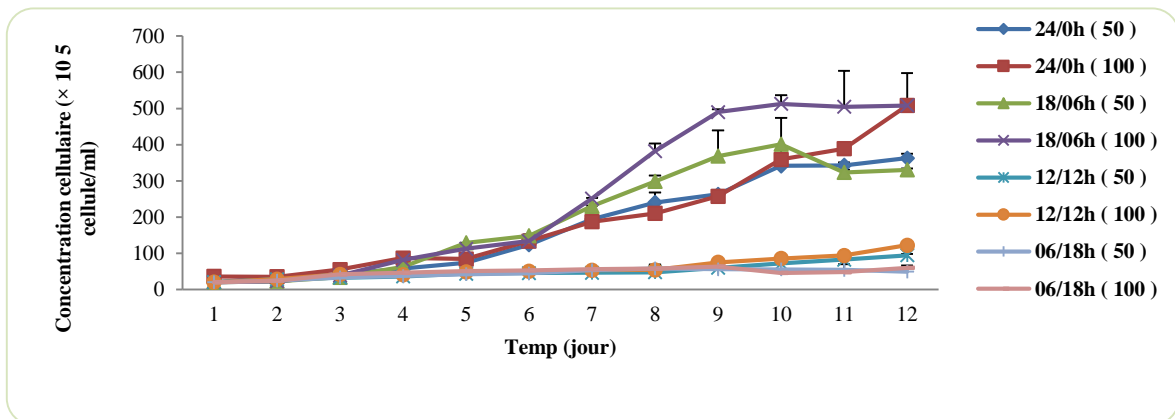


Figure 32 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de *N. gaditana* cultivée sous différents flux incidents et différentes photopériodes (n=3)

Le tableau 13 représente le taux de croissance, le temps de génération, la biomasse maximale ainsi que la matière sèche produite sous différentes photopériodes et intensités lumineuses. On constate que le meilleur taux de croissance est obtenu sous 18h d'éclairage à $100 \mu\text{mol}$ de photons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($p \leq 0,05$) avec une valeur égale à $0,360 \text{ J}^{-1} \pm 0,006$, et le plus faible sous une photopériode de 06h ($0,08 \text{ J}^{-1} \pm 0,05$).

Tableau 13 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche *N. gaditana* cultivée sous différents flux incidents et différentes photopériodes (n=3), les taux de croissance portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$).

Traitements	μ (J^{-1})	G (J)	B M ($\times 10^5$ cellule/ml)	M S (mg/l)
24h/24h(50)	0,315 \pm 0,001 (a)	2,2	362,66 \pm 12,85	1310,01 \pm 46,76
24h/24h(100)	0,320 \pm 0,009 (a)	2,16	405 \pm 9,16	1471,98 \pm 33,33
18h/06h(50)	0,331 \pm 0,010 (b)	2,09	401 \pm 72,54	1456,43 \pm 263,85
18h/06h(100)	0,360 \pm 0,006 (c)	1,925	557 \pm 54,28	1913,06 \pm 197,43
12h/12h(50)	0,141 \pm 0,003 (d)	4,91	94,33 \pm 3,78	341,09 \pm 13,76
12h/12h(100)	0,161 \pm 0,002 (d)	4,304	122 \pm 6,92	450,98 \pm 30,86
06h/18h(50)	0,112 \pm 0,016 (e)	6,187	55,33 \pm 8,02	218,40 \pm 18
06h/18h(100)	0,080 \pm 0,050 (f)	8,662	60 \pm 11,31	211,15 \pm 30,93

En ce qui concerne la variation de la composition biochimique en fonction du flux incident et des différentes photopériodes, l'analyse statistique ANOVA 1 montre un effet significatif ($p \leq 0,05$). La figure 33 illustre les pourcentages des composés biochimiques (protéines, carbohydrates, lipides et pigments (Chlorophylle a et caroténoïdes)) de la souche *Nannochloropsis gaditana* sous différentes intensités lumineuses et photopériodes (24/0, 18/06, 12/12 et 06/18h lumière/obscurité).

En termes de valeurs absolues le meilleur pourcentage en carbohydrates (17,16 % \pm 1,14) et celui des lipides ($p \leq 0,05$) (24,07 % \pm 1,30) a été obtenu sous une culture exposée à 24h d'illumination et une intensité lumineuse de 100 μmol de photons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (figure 33 a). La meilleure valeur en protéines ($p \leq 0,05$) (31,14 % \pm 3,38) est notée sous 18h d'éclairage à (100 μmol de photons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

La figure 33b évoque la concentration des pigments (chlorophylle a et caroténoïdes), la chlorophylle a présente le plus grand pourcentage ($p \leq 0,05$) (3,66% (\pm 0,08)) sous 18h de lumière et 06h d'obscurité (100 μmol de photons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Les cellules renferment également un pourcentage égal à 0,90% (\pm 0,003) en caroténoïdes sous la même photopériode mais sous une intensité plus importante (100 μmol de photons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

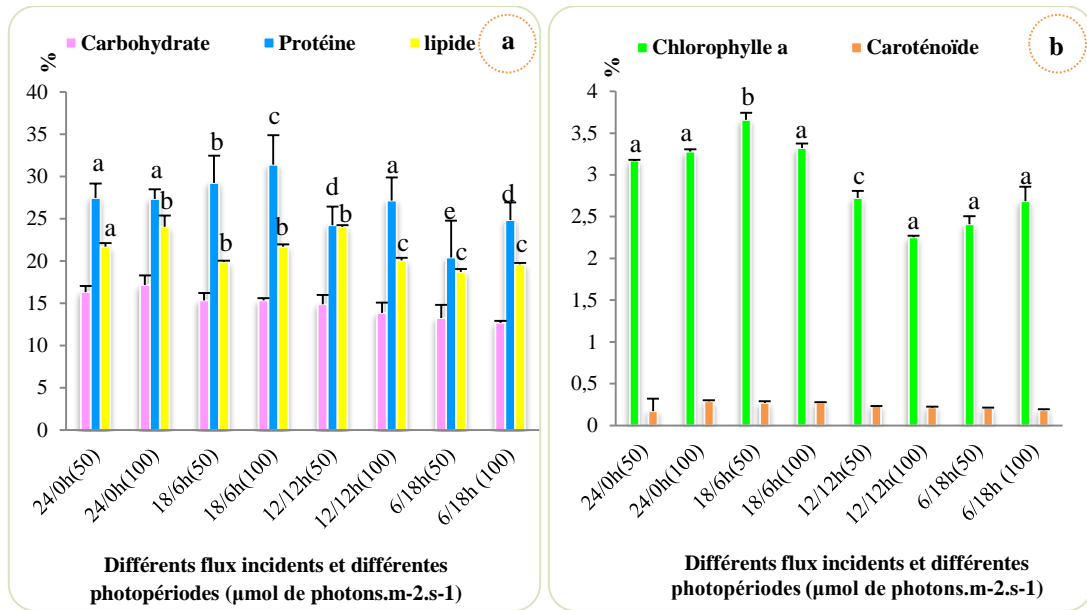


Figure 33 : Variation de la composition biochimique de la souche *N. gaditana* cultivée sous différents flux incidents et différentes photopériodes (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

III.2.1.1.2. Influence de la température sur la croissance cellulaire et la composition biochimique

Les résultats relatifs à l'effet de la température sur la croissance cellulaire de *Nannochloropsis gaditana* sont présentés dans la figure 34.

La concentration initiale est faible de J_1 à J_3 , puis augmente jusqu'au 12^{ème} jour et ce pour chaque température, afin d'atteindre un maximum de $287,5 \pm 4,94 \times 10^5$ cellule/ml, $379 \pm 12,48 \times 10^5$ cellule/ml et $361,5 \pm 2,12 \times 10^5$ cellule/ml à 20°C, 25°C et 30°C respectivement. Néanmoins le taux de croissance cellulaire est significativement ($p \leq 0,05$) plus important sous une température de 25°C avec une valeur égale à $(0,316 \pm 0,001 J^{-1})$ (tableau 14).

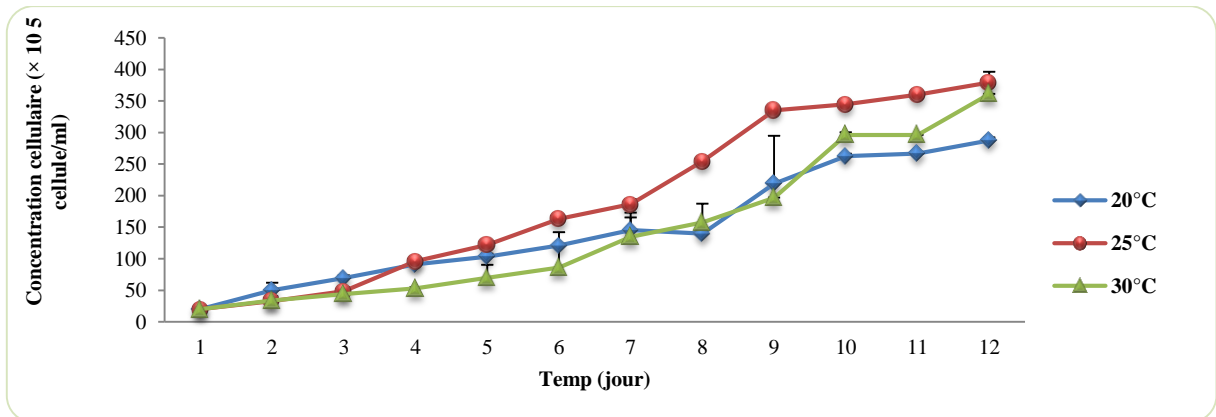


Figure 34 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de *N. gaditana* cultivée sous différentes températures (n=3)

Tableau 14 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche *N gaditana* cultivée sous différentes température (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

Traitements	μ (J^{-1})	G (J)	BM ($\times 10^5$ cellule/ml)	MS (mg/l)
20°C	0,226 \pm 0,003 (a)	2,41	287,5 \pm 4,94	1049,63 \pm 18
25°C	0,244 \pm 0,001 (b)	2,19	379 \pm 12,48	1374,42 \pm 45,42
30°C	0,243 \pm 0,004 (a)	2,30	361,5 \pm 2,12	1314,77 \pm 7,71

La figure 35, montre l'évaluation du pourcentage des composants biochimiques de la souche marine *N gaditana* enregistrés sous les trois températures testées. L'analyse statistique révèle un effet significatif ($p \leq 0,05$).

Les meilleurs pourcentages en composants biochimiques à savoir les carbohydrates, les protéines ainsi que ceux des lipides sont enregistrés sous une culture exposée à une température de 25°C avec des valeurs égales à (17,92% \pm 0,65), (31,08% \pm 2,52) et (28% \pm 1,39) respectivement.

L'analyse statistique ne révèle aucun effet de la température sur la composition en pigments ($p \geq 0,05$). En termes de valeurs absolues les meilleurs pourcentages en chlorophylle ont été obtenus sous une température plus élevée que l'optimum 30°C (3,71% \pm 0,07), de même pour les caroténoïdes (0,339% \pm 0,004).

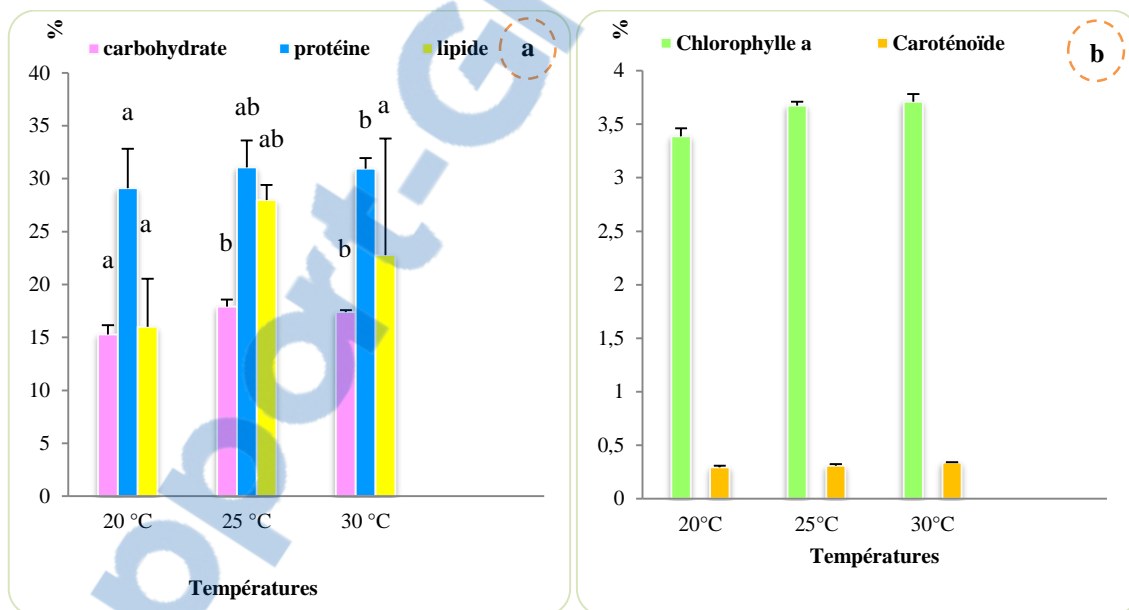


Figure 35 : Variation de la composition biochimique de la souche *N gaditana* cultivée sous différentes températures (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

III.2.1.1.3. Influence du pH sur la croissance cellulaire et la composition biochimique

L'analyse statistique montre un effet significatif des différents pH sur le taux de croissance de la souche *N gaditana*, le suivi de la croissance cellulaire révèle que cette dernière présente une meilleure croissance à pH8 (0,316 \pm 0,005 j^{-1}) (tableau 15), nous notons une croissance faible les deux premiers jours (phase de latence) puis accélérée à partir de J₃ pour atteindre une valeur maximale en fin d'expérimentation (379 \pm 12,48 $\times 10^5$ cellule/ml). Cette souche exprime une croissance modérée à pH10 (0,245 \pm 0,001 j^{-1}) et pH6 (0,277 \pm 0,001 j^{-1}) mais ne résiste pas à un pH très acide pH4 (figure 36).

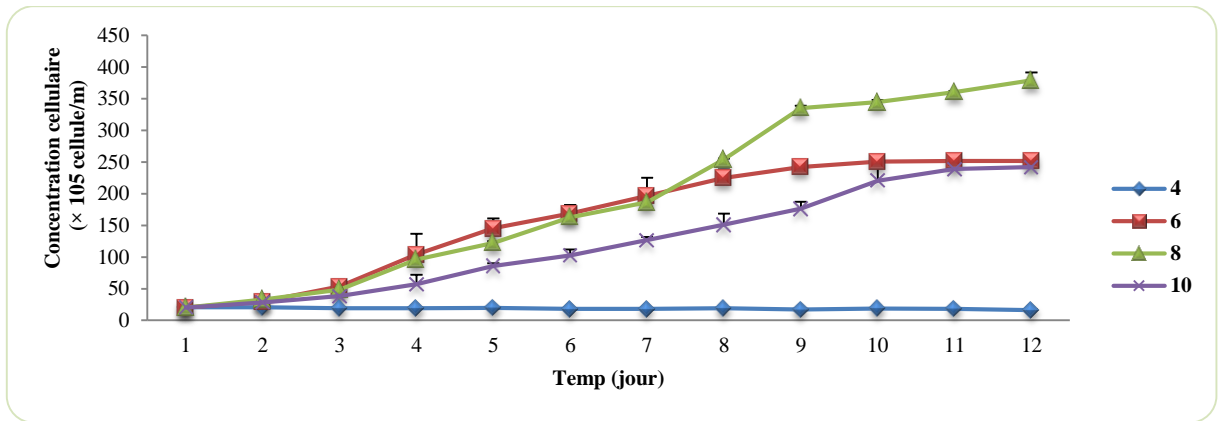


Figure 36 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de *N. gaditana* cultivée sous différents pH (n=3)

Tableau 15 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche *N. gaditana* cultivée sous différents pH, (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

Traitements	μ (J^{-1})	G (J)	BM ($\times 10^5$ cellule/ml)	MS (mg/l)
10	$0,245 \pm 0,001$ (a)	2,82	$240 \pm 7,21$	$869,24 \pm 26,22$
8	$0,316 \pm 0,005$ (b)	2,19	$379 \pm 12,48$	$1378,42 \pm 45,42$
6	$0,277 \pm 0,001$ (c)	2,50	$254,66 \pm 3,05$	$926 \pm 11,11$
4	-	-	-	-

La figure 37 représente les pourcentages des composants biochimiques cellulaires de *N. gaditana* cultivée sous différents pH. L'analyse statistique ne révèle aucun effet significatif ($p \geq 0,05$).

En termes de valeurs absolues le pourcentage en protéines de la souche cultivée à pH8 est estimé à ($31,08\% \pm 2,52$) et représente donc la meilleure valeur suivie par celui des lipides ($23,23\% \pm 4,18$), tandis que le meilleur pourcentage en carbohydrates est noté sous pH6 ($13,83\% \pm 1,12$) (figure 37a). Un pH égal à 8 permet d'obtenir le meilleur pourcentage en chlorophylle a avec une valeur égale à ($3,67\% \pm 0,03$). Celui des caroténoïdes est enregistré sous pH6 ($0,326\% \pm 0,003$) (figure 37b).

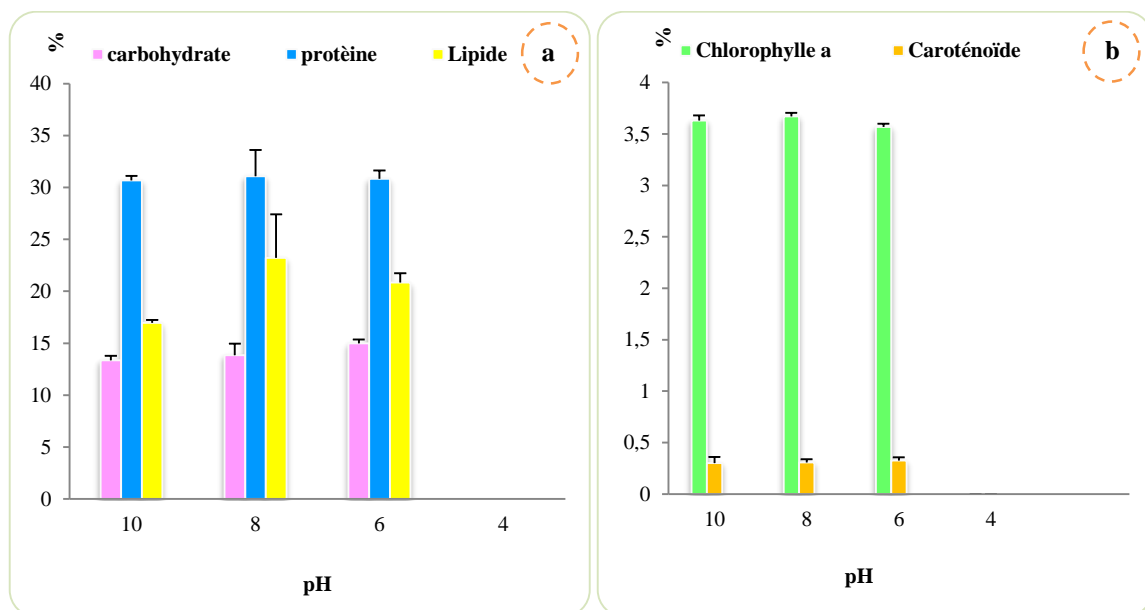


Figure 37 : Variation de la composition biochimique de la souche *N. gaditana* cultivée sous différents pH (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

III.2.1.1.4. Influence de la salinité sur la croissance cellulaire et la composition biochimique

La figure 38 représente les valeurs moyennes de la concentration cellulaire mesurées pour chaque salinité.

Nous enregistrons des phases de latence très courte (une journée) suivie par une augmentation très accélérée jusqu'à J₈ et ceux pour tous les teneurs en NaCl, qui se stabilisent par la suite et atteignent une valeur maximale de $459 \pm 6,55 \times 10^5$ cellule/ml sous 30 PSU.

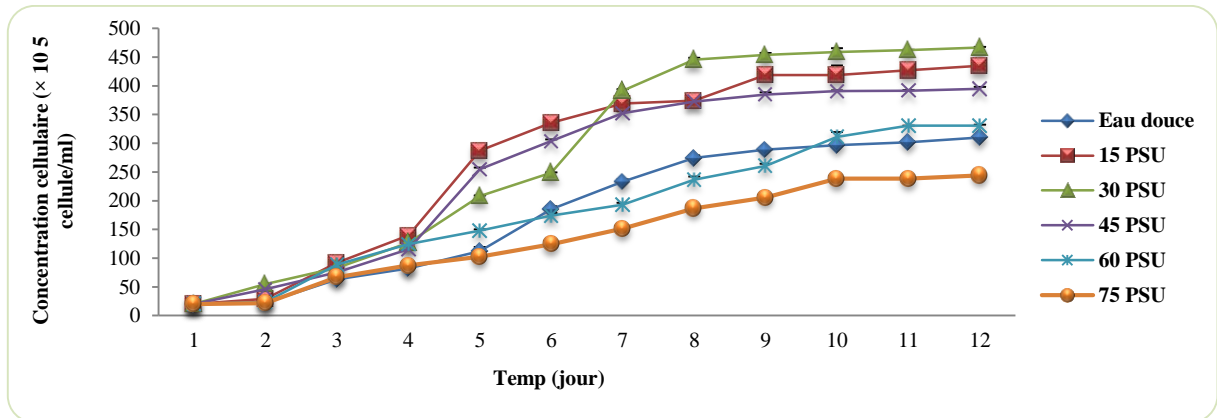


Figure 38 : Evolution temporelle de l'effet de la salinité sur la concentration cellulaire de *Nannochloropsis gaditana* cultivée sous différentes salinités (n=3)

En outre, la culture en eau douce et celle à 75 PSU marque une croissance plus lente avec un taux de croissance de $0,299 \text{ J}^{-1} \pm 0,0005$ et $0,274 \text{ J}^{-1} \pm 0,002$ respectivement ($p \leq 0,05$) (tableau 16).

Tableau 16 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche *N. gaditana* cultivée sous différentes salinités (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

Traitements	μ (J^{-1})	G (J)	BM ($\times 10^5$ cellule/ml)	MS (mg/l)
Eau douce	$0,299 \pm 0,0005$ (a)	2,31	$310 \pm 1,41$	$1120,47 \pm 3,63$
15 PSU	$0,341 \pm 0,002$ (b)	2,03	432 ± 8	$1575,18 \pm 29,09$
30 PSU	$0,347 \pm 0,001$ (c)	1,99	$459 \pm 6,55$	$1664,02 \pm 23,84$
45 PSU	$0,333 \pm 0,001$ (d)	2,08	391 ± 1	$1426,88 \pm 3,637$
60 PSU	$0,310 \pm 0,0002$ (e)	2,23	$328,33 \pm 8,02$	$1198,14 \pm 29,17$
75 PSU	$0,274 \pm 0,002$ (f)	2,529	$238,33 \pm 6,02$	$869,81 \pm 21,92$

Les pourcentages en lipides ($26,02\% \pm 1,35$) et en protéines ($29,60\% \pm 0,58$) sont significativement ($p \leq 0,05$) plus importants sous une salinité correspondant à 30 et 60 PSU respectivement. Le pourcentage en carbohydrates atteint un maximum de ($15,65\% \pm 0,21$) sous 30 PSU.

La figure 39 représente le pourcentage en pigments de la souche *N. gaditana* cultivée sous plusieurs salinités. Le test statistique révèle une différence significative des pourcentages en chlorophylle a ($p \leq 0,05$), la meilleure valeur est notée sous une salinité de 45 PSU ($4,84\% \pm 0,007$).

Aucune différence significative ($p \geq 0,05$) n'est enregistrée pour les caroténoïdes mais en termes de valeurs absolues le plus grand pourcentage est de ($0,246\% \pm 0,002$) sous 75 PSU.

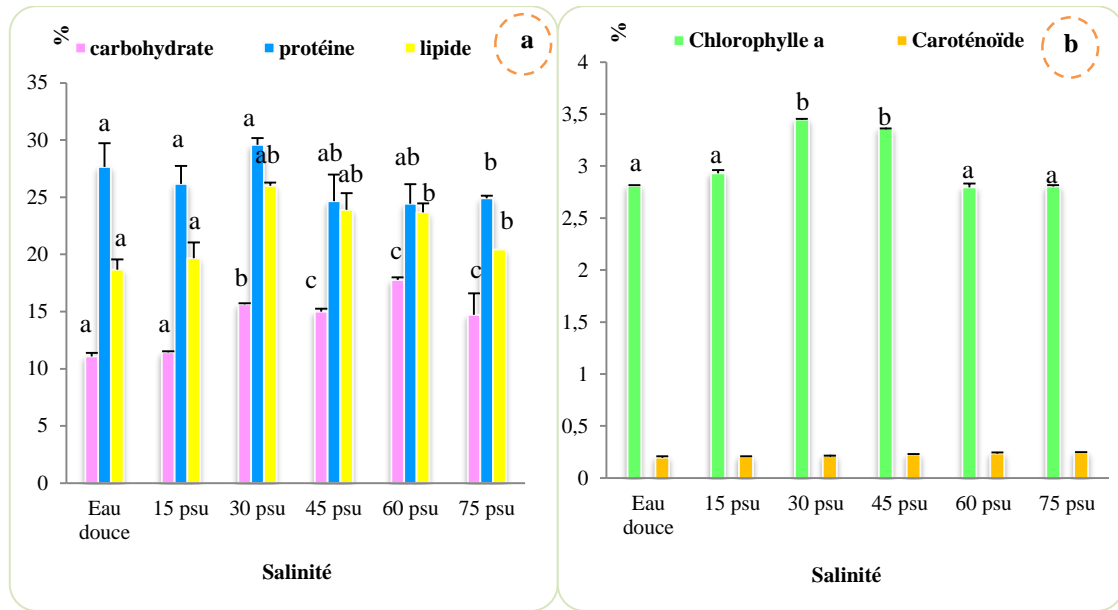


Figure 39 : Variation de la composition biochimique de la souche *N. gaditana* cultivée sous différentes salinités (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents (p≤ 0,05)

III.2.1.1.5. Étude de différentes géométries de photobioréacteur

- **Influence des différentes géométries de photobioréacteur (surface spécifique éclairée) sur la croissance et la composition biochimique.**

La croissance cellulaire varie significativement (p≤ 0,05) en variant la surface spécifique éclairée, elle démarre lentement puis augmente progressivement jusqu'à J₉ et ce sous toutes les conditions de cultures testées. Au-delà de cette période la croissance se stabilise et atteint le meilleur taux de croissance (0,336 j⁻¹ ± 0005) sous une surface spécifique éclairée de 0,2 m⁻¹ avec une matière sèche égale à 1560,55 mg/l ± 23,84 (tableau 17). Le taux de croissance augmente en augmentant la surface spécifique éclairée.

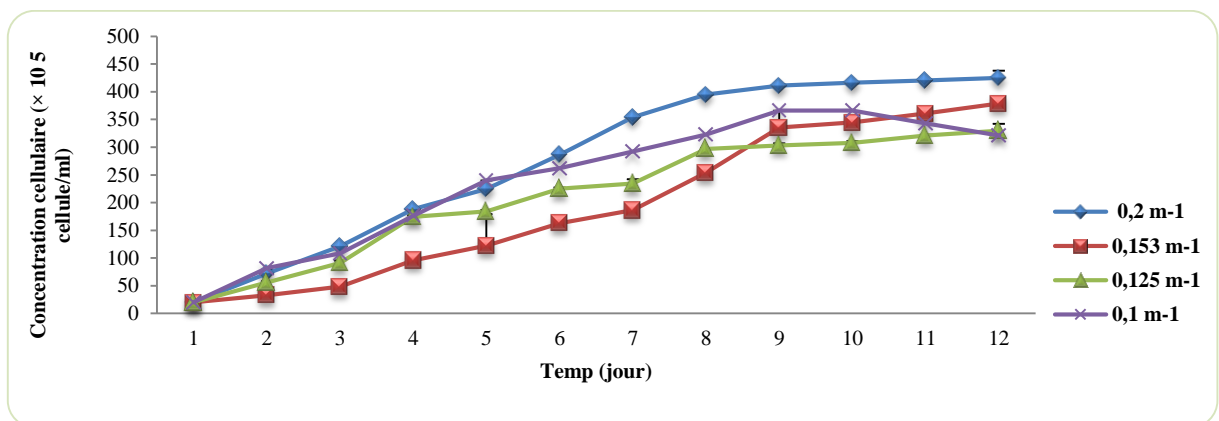


Figure 40 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de *N. gaditana* selon la surface spécifique éclairée (n=3).

Tableau 17 : Détermination du taux de croissance maximale (μM), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche *N. gaditana* cultivée sous différentes surfaces spécifiques éclairée (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents (p≤ 0,05).

Traitements	μ M (J ⁻¹)	G (J)	B M (×10 ⁵ cellule/ml)	M S (mg/l)
-------------	------------------------	-------	-----------------------------------	------------

0,2 m⁻¹	0,336 ± 0,005 (a)	2,06	429 ± 6,55	1560,55 ± 23,84
0,153 m⁻¹	0,316 ± 0,001 (b)	2,19	344,66 ± 3,51	1255,55 ± 12,7
0,125 m⁻¹	0,303 ± 0,001 (c)	2,28	306,66 ± 4,93	1114,35 ± 17,94
0,1 m⁻¹	0,322 ± 0,001 (d)	2,15	366 ± 4,39	1328,69 ± 15,85

La composition biochimique de *N gaditana* est significativement ($p \leq 0,05$) influencée par la valeur de la surface spécifique éclairée, tous les composants enregistrent des pourcentages plus élevés ($p \leq 0,05$) sous 0,2 m⁻¹ de surface spécifique éclairée ((15,26% ± 0,54) en carbohydrates, (33,02% ± 0,7) en protéines et (27,36% ± 0,91) en lipides) (figure 41a), de même pour la chlorophylle a qui affiche une valeur égale à (4,19% ± 0,0005), en revanche une surface spécifique éclairée de 0,125 m⁻¹ permet à la cellule d'accumuler le plus grand pourcentage en caroténoïdes (0,294% ± 0,007) ($p \geq 0,05$) (figure 41b).

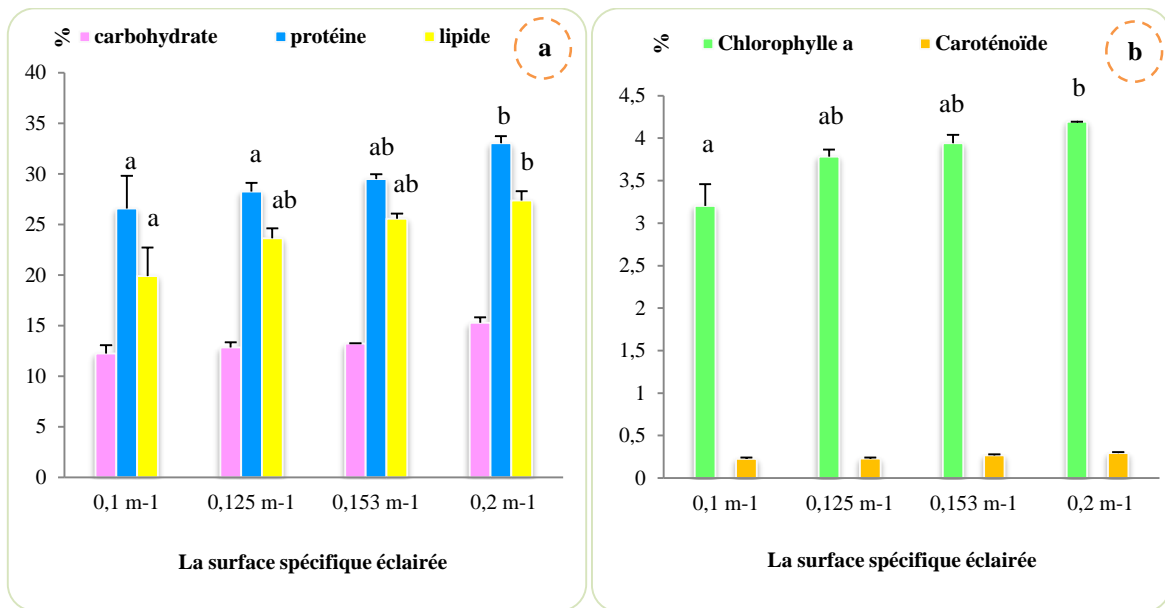


Figure 41 : Variation de la composition biochimique de la souche *N gaditana* cultivée sous différentes surfaces spécifiques éclairées (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

- **Elaboration et test d'un système de culture à l'échelle pilote (système de type plat)**

L'analyse statistique révèle un effet significatif ($p \leq 0,05$) de la géométrie du système de culture sur le taux de croissance enregistré, néanmoins nous constatons une similitude dans la cinétique de croissance de la souche *N gaditana* du début de la période expérimentale jusqu'à J₇. A partir de J₈ la croissance s'accélère pour atteindre une valeur maximale de $430 \pm 10,066 \times 10^5$ cellule/ml ($p \leq 0,05$) (figure 42) et un taux de croissance égal à $0,319 \pm 0,001$ J⁻¹ en utilisant le photobioacteur plat (tableau 18).

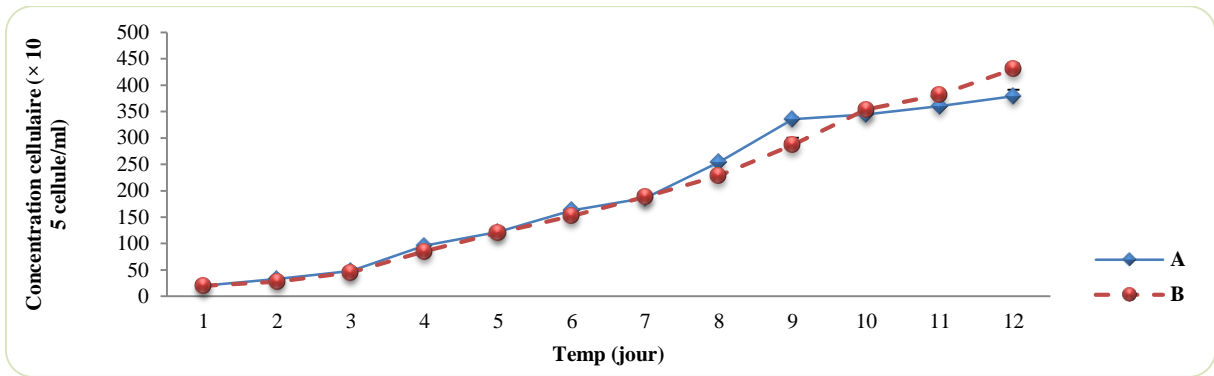


Figure 42 : Comparaison d'une évolution temporelle de la concentration cellulaire de *N gaditana* cultivées dans deux systèmes de culture distincts (A : miniphotobioacteur cylindrique) et (B : système de culture de type plat) (n=3)

Tableau 18 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche *N gaditana* cultivée dans deux systèmes de culture distincts (A : miniphotobioacteur cylindrique), (B : système de culture de type plat) (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$).

Traitements	μ (J^{-1})	G (J)	BM ($\times 10^5$ cellule/ml)	MS (mg/l)
A	$0,316 \pm 0,001$ (a)	2,19	$379 \pm 12,48$	$1378,42 \pm 45,42$
B	$0,319 \pm 0,001$ (b)	2,17	$430 \pm 10,066$	$1569,33 \pm 36,61$

L'étude de ces deux systèmes de culture ne révèle aucun effet significatif ($p \geq 0,05$) du système de culture de type plat sur la composition biochimique de la souche *N gaditana* : en termes de valeurs absolues nous enregistrons des valeurs très rapprochées en faveur du système plat ($14,57\% \pm 0,58$) en carbohydrates, ($32,92\% \pm 2,62$) en protéines et ($23,99\% \pm 4,14$) en lipides (figure 43a). Cet effet significativement positif ($p \leq 0,05$) se poursuit pour les pigments qui voient leurs pourcentages augmentés lors de l'utilisation du photobioacteur plat ($3,96\% \pm 0,53$) en chlorophylle a et ($1,61\% \pm 0,024$) de caroténoïdes (figure 43b).

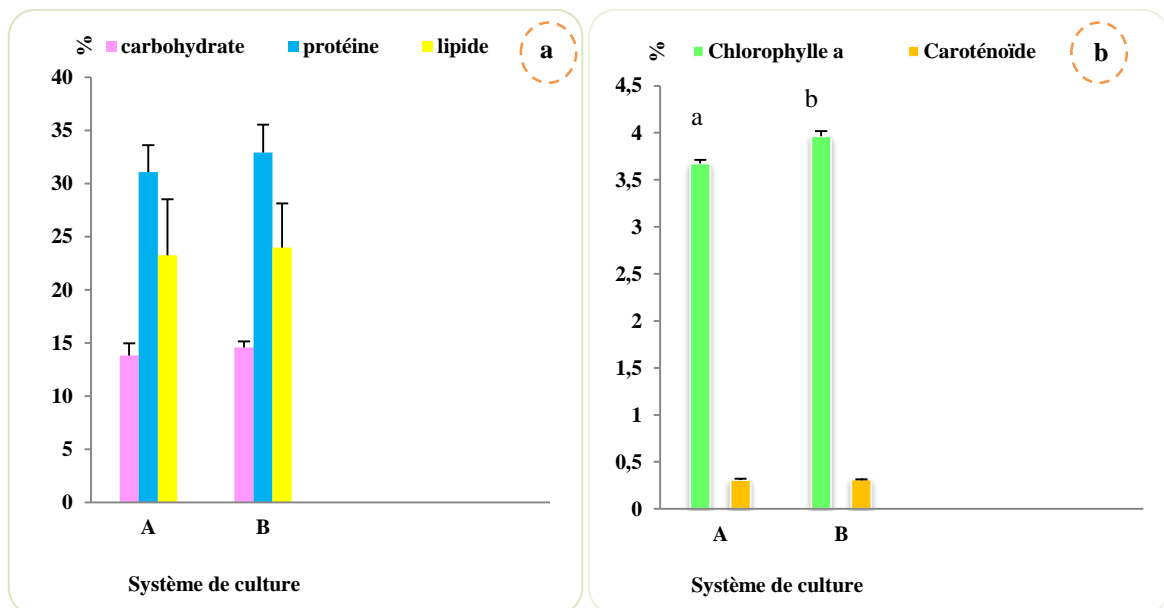


Figure 43 : Variation de la composition biochimique de la souche *N gaditana* cultivée dans deux systèmes de culture distincts (A : miniphotobioacteur cylindrique), (B : système de culture de type plat) (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$).

III.2.1.2. *Tetranephris brasiliensis*

III.2.1.2.1. Influence des flux incidents et différentes photopériodes sur la croissance cellulaire et la composition biochimique

L'analyse statistique ANOVA1 montre un effet significatif ($p \leq 0,05$) de l'intensité lumineuse ainsi que des différentes photopériodes sur le taux de croissance cellulaire.

Du premier jusqu'au troisième jour de chaque photopériode, la croissance cellulaire est dans un état de latence avec des valeurs moyennes de concentration cellulaire variant entre 20 et 55 millions cellules/ml, suivie d'une phase exponentielle pour atteindre la valeur maximale de 441,66 millions cellules/ml à J₁₂ sous 24h d'éclairement à 100 μmol de photons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($p \leq 0,05$). La figure ci-dessous (figure 44) représente l'effet de l'intensité lumineuse et les différentes photopériodes en fonction du temps.

A partir de J₃, la phase exponentielle démarre avec une évolution progressive jusqu'à la fin de la période expérimentale où elle atteint la meilleure concentration cellulaire ($389,66 \pm 6,80 \times 10^5$ cellules/ml) sous éclairage continu, ainsi qu'une faible concentration cellulaire ($96 \pm 4,24 \times 10^5$ cellules/ml) sous une photopériode de 06h de lumière/18h d'obscurité 50 μmol de photons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

On remarque une forte augmentation (phase exponentielle) de J₃ jusqu'à J₉ sous 18h d'illumination suivie d'une phase stationnaire de J₉ jusqu'à J₁₀ avec une concentration cellulaire égale à $281,33 \pm 28,006 \times 10^5$ cellules/ml à 50 μmol de photons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

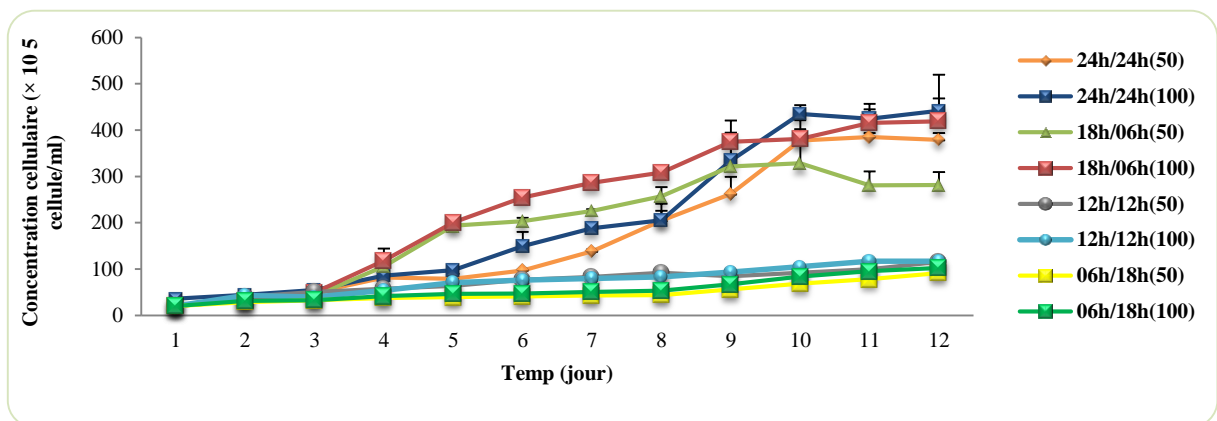


Figure 44 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de *Tetranephris brasiliensis* cultivées sous différents flux incidents et différentes photopériodes (n=3)

Le tableau ci-dessous (tableau 19) représente les valeurs des concentrations maximales, le taux de croissance, le temps de génération ainsi que la matière sèche correspondant à chaque photopériode et intensités lumineuses.

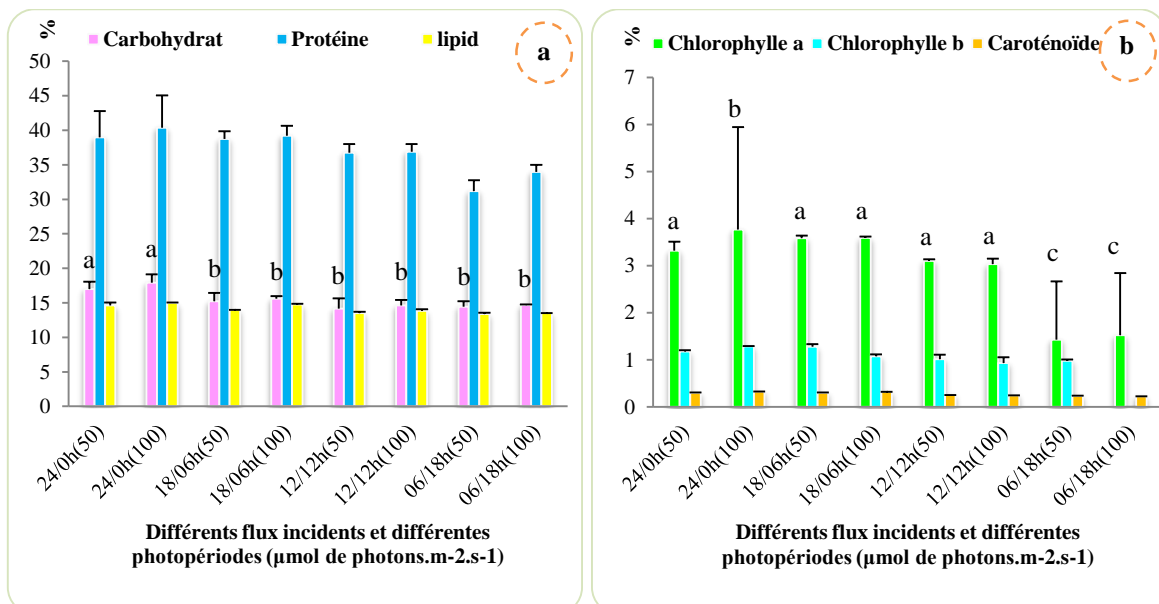
Le taux de croissance le plus faible est enregistré sous une photopériode de 06h lumière/18h obscurité ($p \leq 0,05$) avec une valeur de $0,169 \text{ J}^{-1}$ ($\pm 0,001$) à 50 μmol de photons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, en revanche le meilleur taux de croissance est enregistré sous une photopériode de 24h à 50 μmol de photons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ avec une valeur de $0,342 \text{ J}^{-1}$.

Tableau 19 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche *Tétranephris brasiliensis* cultivée sous différents flux incidents et différentes photopériodes (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$).

Traitements	μ (J^{-1})	G (J)	B M ($\times 10^5$ cellule/ml)	M S (mg/l)
24h/0h(50)	$0,327 \pm 0,0007(a)$	2,11	$389,66 \pm 6,80$	$431,36 \pm 7,53$
24h/0h(100)	$0,342 \pm 0,004 (a)$	2,02	$441,66 \pm 26,40$	$488,92 \pm 29,54$
18h/06h(50)	$0,308 \pm 0,02 (ab)$	2,25	$328,33 \pm 73,66$	$363,46 \pm 81,54$
18h/06h(100)	$0,317 \pm 0,01 (ab)$	2,18	$454,66 \pm 40,15$	$527,48 \pm 44,45$
12h/12h(50)	$0,137 \pm 0,003 (b)$	5,05	$117 \pm 2,82$	$129,51 \pm 3,13$
12h/12h(100)	$0,159 \pm 0,001 (b)$	4,35	$116 \pm 4,24$	$128,41 \pm 4,69$
06h/18h(50)	$0,184 \pm 0,001 (c)$	3,76	$96 \pm 4,24$	$106,27 \pm 3,91$
06h/18h(100)	$0,169 \pm 0,006 (c)$	4,10	$105 \pm 2,82$	$116,23 \pm 3,13$

La figure 45 illustre les pourcentages des composées biochimiques de la souche *T. brasiliensis* sous différentes intensités lumineuses (50 et 100 μmol de photons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) et différentes photopériodes (24/0, 18/06, 12/12 et 06/18 h L/O). L'analyse statistique ne montre aucun effet significatif ($p \geq 0,05$) de la lumière sur le pourcentage en protéines, lipides, chlorophylle b et les caroténoïdes, contrairement au carbohydrate et a chlorophylle a ($p \leq 0,05$).

En termes de valeurs absolues les meilleurs résultats (pourcentages) notés en carbohydrates, en protéines ainsi qu'en lipides sont de $17,90\% \pm 4,67$, $40,37\% \pm 1,23$ et $15\% \pm 11,10$ respectivement sous illumination continue à 100 μmol de photons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. La concentration en chlorophylle a de la souche *T. brasiliensis* montre également une hausse significative ($p \leq 0,05$) sous cette même photopériode et intensité lumineuse avec un pourcentage égal à $3,76\% \pm 2,17$, $1,28\% \pm 0,01$ et $0,327\% \pm 0,007$ pour la chlorophylle a, chlorophylle b et les caroténoïdes respectivement.



III.2.1.2.2. Influence de la température sur la croissance cellulaire et la composition biochimique

Pour ce qui est de l'effet de différentes températures sur le taux de la croissance cellulaire l'ANOVA 1 ne montre aucune différence significative ($p \geq 0,05$) (tableau 20). Au moment de l'inoculation, la croissance cellulaire est estimée à 20×10^5 cellule/ml, la croissance cellulaire augmente jusqu'au 12^{ème} jour où elle atteint son maximum ($296 \pm 9,89 \times 10^5$ cellule/ml, $446 \pm 1,41 \times 10^5$ cellule/ml à 20°C et 25°C respectivement) et $343,6 \pm 24,58 \times 10^5$ cellule/ml au bout du 11^{ème} jour à 30°C (figure 46).

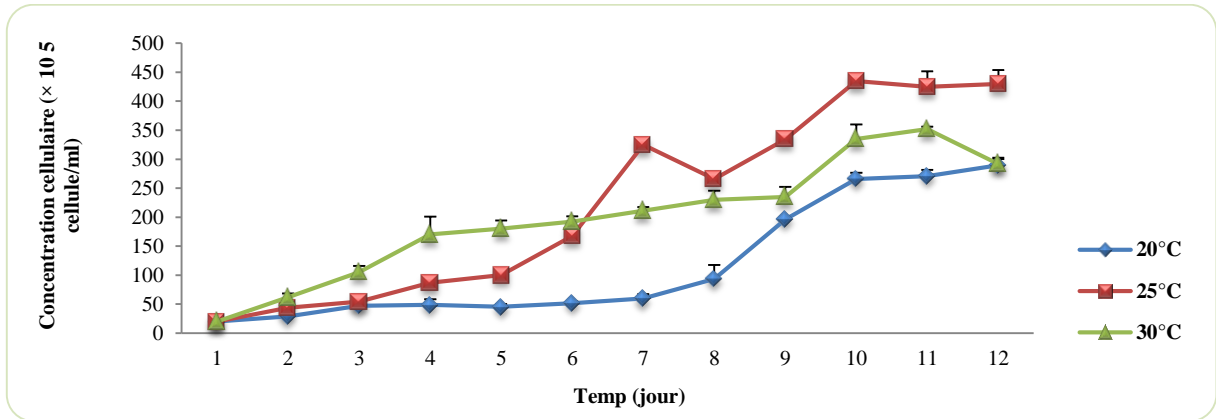


Figure 46 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de *Tétranephris brasiliensis* cultivée sous différentes températures (n=3)

Tableau 20 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche *Tétranephris brasiliensis* cultivée sous différentes températures (n=3)

Traitements	μ (J ⁻¹)	G (J)	BM ($\times 10^5$ cellule/ml)	MS (mg/l)
20°C	$0,290 \pm 0,001$	2,38	$296 \pm 9,89$	$328,67 \pm 10,95$
25°C	$0,344 \pm 0,005$	2,01	$446 \pm 1,41$	$492,72 \pm 1,56$
30°C	$0,312 \pm 0,008$	2,22	$343,6 \pm 24,58$	$380,43 \pm 27,21$

Suite au dosage effectué en fin de la phase exponentielle nous enregistrons les meilleurs pourcentages en carbohydrates ($18,77\% \pm 0,23$), protéines ($42,19\% \pm 0,85$) et lipides ($18,59\% \pm 0,48$) sous des températures égales à 25°C , 30°C et 20°C respectivement ($p \leq 0,05$). Une température de 25°C permet d'obtenir un pourcentage de $4,19\% \pm 0,05$ en chlorophylle a et $1,53\% \pm 0,007$ en chlorophylle b, en revanche nous notons le meilleur pourcentage en caroténoïdes ($0,310 \pm 0,03$) sous 30°C ($p \leq 0,05$) (figure 47 b).

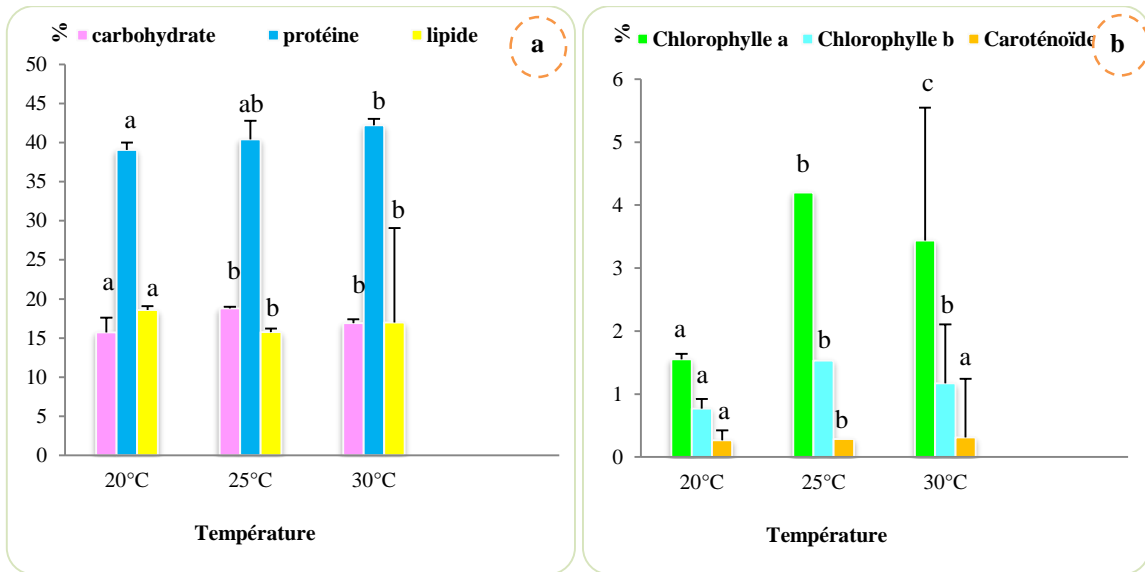


Figure 47 : Variation de la composition biochimique de la souche *Tétranephris brasiliensis* cultivée sous différentes températures (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents (p≤0,05)

III.2.1.2.3. Influence du pH sur la croissance cellulaire et la composition biochimique

L'analyse statistique montre un effet significatif (p≤ 0,05) du pH sur la croissance cellulaire de *T brasiliensis*.

En effet la croissance fluctue de manière significative (p≤ 0,05) à pH8 passant de 20 à 379 ± 12,48× 10⁵ cellule/ml (figure 48) avec un taux de croissance égal à 0,316 ± 0,0005 j⁻¹ au bout de 10 jour de culture (tableau 20). A pH4 nous n'enregistrons aucune croissance.

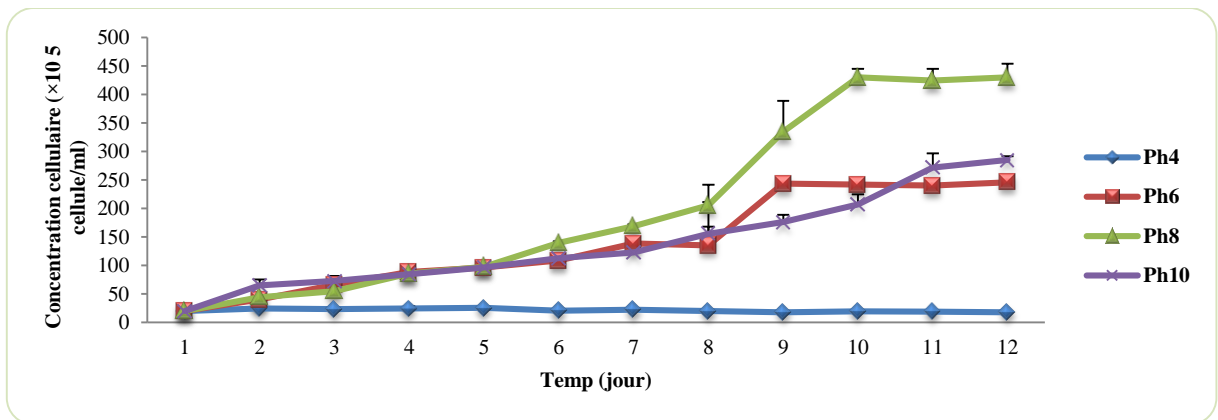


Figure 48 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de *Tétranephris brasiliensis* cultivée sous différents pH (n=3)

Tableau 21 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche *Tétranephris brasiliensis* cultivée sous différents pH (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents (p≤0,05)

Traitements	μ (J ⁻¹)	G (J)	B M (×10 ⁵ cellule/ml)	M S (mg/l)
10	0,245 ± 0,001 (a)	2,82	240 ± 7,21	869,24 ± 26,22
8	0,316 ± 0,0005 (b)	2,19	379 ± 12,48	1378,42 ± 45,42
6	0,277 ± 0,001 (c)	2,50	254,66 ± 3,05	926 ± 11,11
4	-	-	-	-

Nous ne notons aucun effet significatif ($p \geq 0,05$) du pH sur la composition biochimique après étude statistique, en termes de valeurs absolues les meilleurs pourcentages en carbohydrates, protéines et lipides sont enregistrés à pH8 avec des valeurs de $17,54\% \pm 0,16$, $41,27\% \pm 4,71$ et $15,47\% \pm 0,38$ respectivement (figure 49a). C'est le cas aussi pour les pigments avec des valeurs maximales de $3,66\% \pm 0,01$ en chlorophylle a, $0,290\% \pm 0,01$ en chlorophylle b et $2,38\% \pm 0,01$ en caroténoïdes (figure 49b).

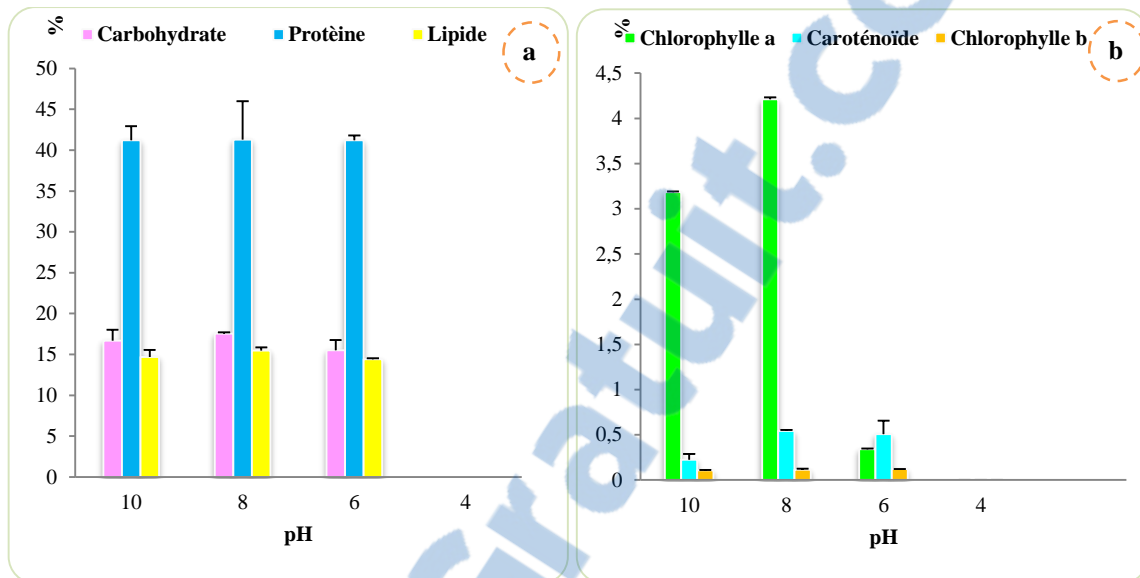


Figure 49 : Variation de la composition biochimique de la souche *Tétranepris brasiliensis* cultivée sous différents pH (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

III.2.1.2.4. Influence des différentes géométries de photobioréacteur sur la croissance et la composition biochimique

- **Etude de différentes géométries de photobioréacteur (surface spécifique éclairée).**

L'étude statistique ANOVA 1 montre un effet significatif ($p \leq 0,05$) de la surface spécifique éclairée sur la croissance de *T. brasiliensis*. On remarque que le taux de croissance est plus important pour une culture sous $0,2 \text{ m}^{-1}$ ($0,258 \text{ J}^{-1} \pm 0,002$) avec un temps de génération de $2,68 \text{ J}$, soit un temps moins important en comparaison aux trois autres tests (surfaces spécifiques éclairées) (tableau 22).

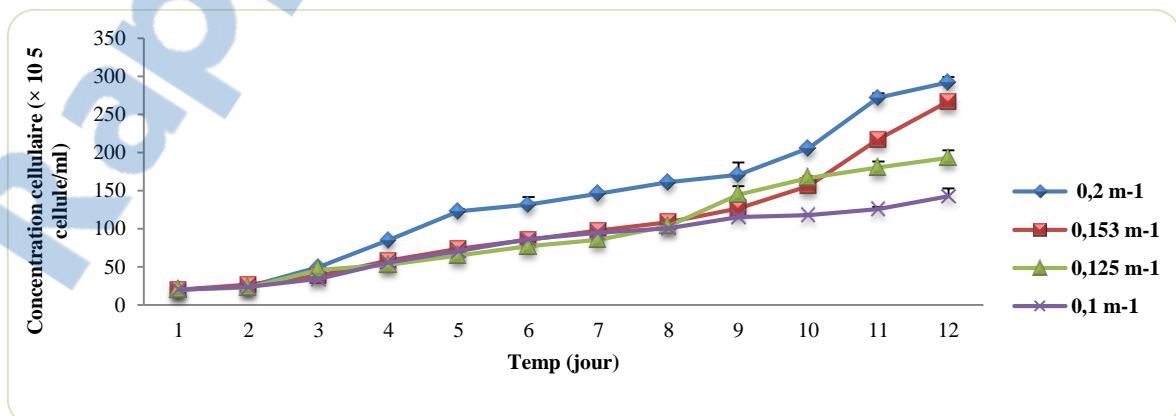


Figure 50 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de *Tétranepris brasiliensis* selon la surface spécifique éclairée (n=3)

Tableau 22 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche *Tetranephris brasiliensis* cultivée sous différentes surfaces spécifiques éclairée (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

Traitements	μ (J ⁻¹)	G (J)	B M ($\times 10^5$ cellule/ml)	M S (mg/l)
0,2 m ⁻¹	0,258 \pm 0,002 (a)	2,68	292,33 \pm 6,80	325,61 \pm 7,53
0,153 m ⁻¹	0,235 \pm 0,001 (b)	2,94	193 \pm 9,84	212,65 \pm 10,90
0,125 m ⁻¹	0,227 \pm 0,001 (c)	3,05	267 \pm 2,64	291,56 \pm 2,92
0,1 m ⁻¹	0,198 \pm 0,001 (d)	3,5	142,66 \pm 7,50	154,74 \pm 8,30

Aucun effet significatif ($p \geq 0,05$) de la surface spécifique éclairée n'a été révélé par l'analyse statistique. En effet les pourcentages en carbohydrates et protéines de la souche étudiée ne varient pas fortement mais restent maximaux à 0,2 m⁻¹ avec des valeurs égales à 18,87% \pm 1,87 et 41,88% \pm 2,1 pour les carbohydrates et les protéines respectivement (figure 47a). Les pourcentages en lipides et pigments augmentent significativement ($p \leq 0,05$) en augmentant la surface spécifique éclairée (figure 51b).

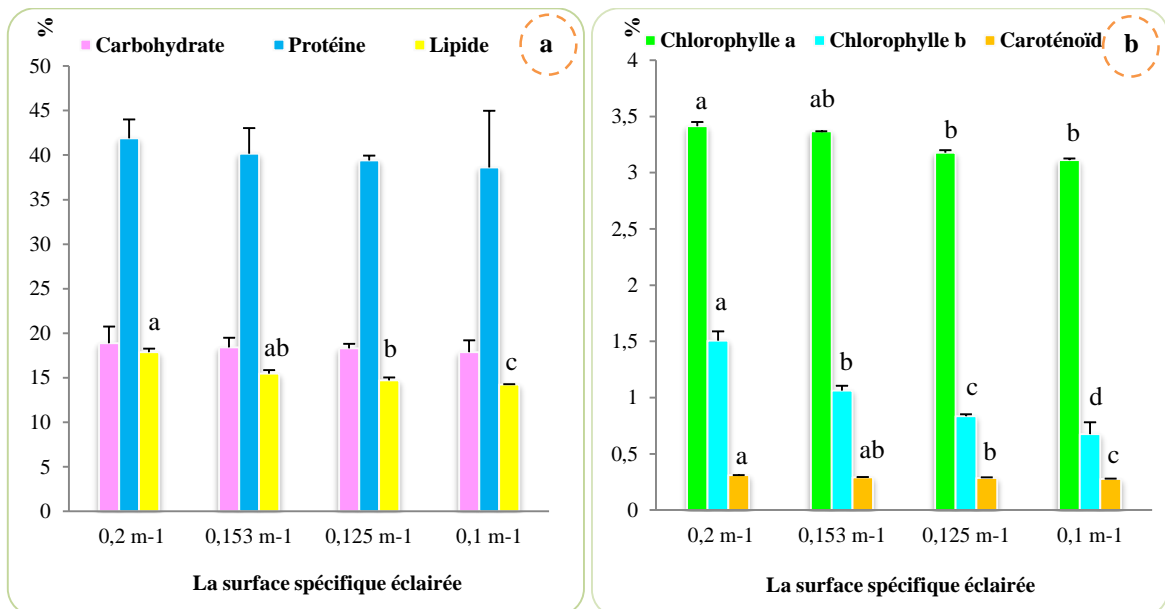


Figure 51 : Variation de la composition biochimique de la souche *Tetranephris brasiliensis* cultivée sous différentes surfaces spécifiques éclairées (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

- **Elaboration et test d'un système de culture (système de culture de type plat) à l'échelle pilote**

La souche cultivée sous les deux systèmes de culture évolue d'une manière similaire et ce jusqu'au cinquième jour où nous notons une augmentation significative ($p \leq 0,05$) de la culture réalisée au niveau du système de culture de type plat (figure 52) avec une biomasse maximale égale à 442,66 \pm 18,009 ($\times 10^5$ cellule/ml) et un taux de croissance de 0,343 J⁻¹ \pm 0,004 (tableau 23).

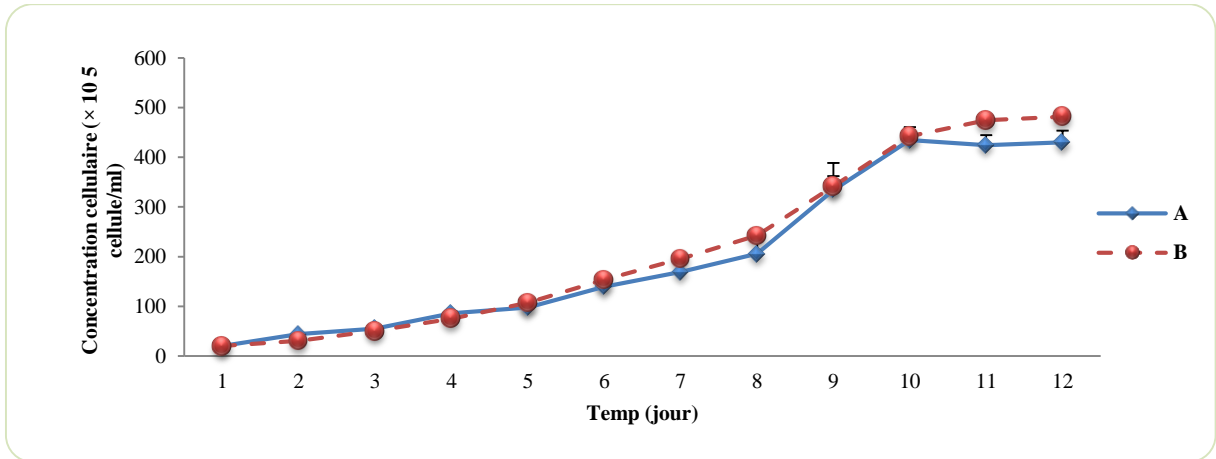


Figure 52 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de *Tétranebris brasiliensis* cultivée dans deux systèmes de culture distincts (A : miniphotobioreacteur cylindrique), (B : système de culture de type plat) (n=3)

Tableau 23 : Détermination du taux de croissance maximale (μM), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche *Tétranebris brasiliensis* cultivée dans deux systèmes de culture distinct (A : miniphotobioreacteur cylindrique), (B : système de culture de type plat) (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

Traitements	μM (J^{-1})	G	BM ($\times 10^5$ cellule/ml)	MS (mg/ml)
A	$0,342 \pm 0,003$ (a)	2,026	$435,66 \pm 19,62$	$480,28 \pm 21,73$
B	$0,343 \pm 0,004$ (b)	2,020	$442,66 \pm 18,009$	$490,03 \pm 19,93$

Le système de culture n’influence pas fortement la composition biochimique de la souche *T. brasiliensis*, sa composition ne subit que de légères variations non significatives ($p \leq 0,05$), on enregistre des valeurs très rapprochées en faveur du système de culture de type plat, ($16,92\% \pm 0,42$) en carbohydrates, ($44,45\% \pm 0,90$) en protéines et ($15,42\% \pm 0,186$) en lipides (figure 53a), de même les pigments voient leurs pourcentages augmentés lors de l’utilisation du système plat ($4,46\% \pm 0,042$), ($0,75\% \pm 0,168$) et ($0,335\% \pm 0,012$) pour la chlorophylle a, la chlorophylle b et les caroténoïdes respectivement (figure 53b).

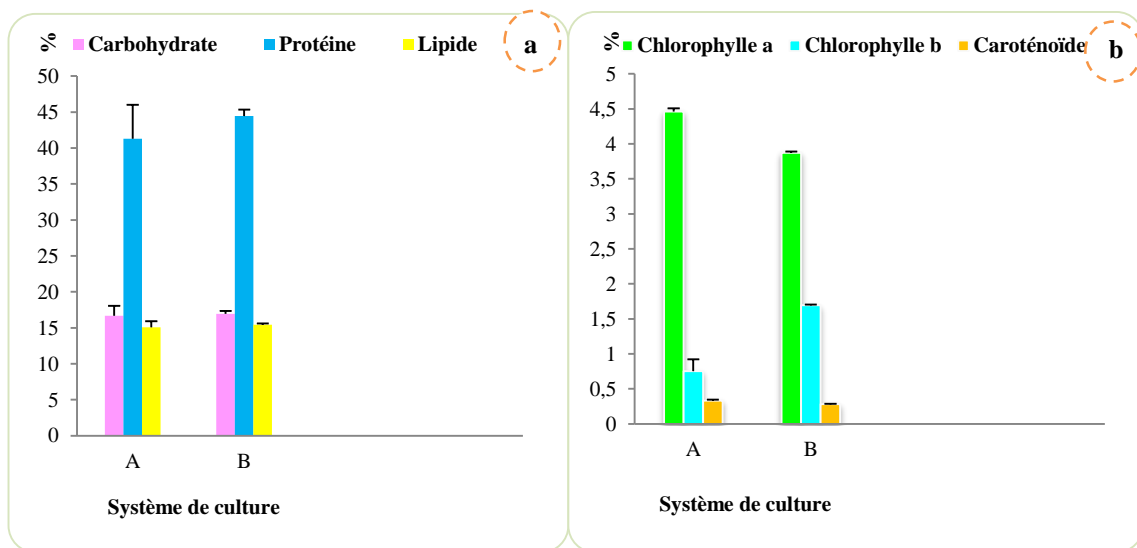


Figure 53 : Variation de la composition biochimique de la souche *Tétranebris brasiliensis* cultivée dans deux systèmes de culture distincts (A : miniphotobioreacteur cylindrique), (B : photobioreacteur plat) (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

III.2.1.3. *Scenedesmus sp.*

III.2.1.3.1. Influence du flux incident et de différentes photopériodes sur la croissance cellulaire et la composition biochimique

L'étude statistique ANOVA 1 montre un effet significatif ($p \leq 0,05$) de la lumière (différents flux incidents et différentes photopériodes). Au début de chaque culture, la croissance cellulaire est faible puis est maintenue dans un état stable de J_1 à J_3 avec des valeurs moyennes de concentration cellulaire variant de 20×10^5 à $404,667 \times 10^5$ cellules/ml selon la photopériode concernée.

A partir de J_3 , une augmentation de la croissance est observée pour les quatre photopériodes. Cette dernière durera un temps précis et variable d'une photopériode à l'autre.

De J_4 à J_{12} , une augmentation de la croissance est observée sous 24h de lumière avec une concentration maximale de $410 \pm 8,88 \times 10^5$ cellules/ml à $q_0 = 100 \mu\text{mol}$ de photons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Sous 12h d'éclairément la croissance est plus faible, elle débute à J_8 pour atteindre son maximum de $84 \pm 6,928 \times 10^5$ cellules/ml à J_{12} . La phase exponentielle débute en J_4 sous 24h d'illumination pour atteindre une croissance maximale de $404,66 \pm 10,78 \times 10^5$ cellules/ml à J_{12} sous une intensité lumineuse de $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (figure 54).

D'autre part, une croissance plus lente est observée avec une photopériode de 06h lumière/18h obscurité, elle débute en J_8 avec une valeur maximale de $84 \pm 6,92$ et $100,33 \pm 13,2 \times 10^5$ cellules/ml à $q_0 = 50 \mu\text{mol}$ de photons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ respectivement.

Le tableau ci-dessous (tableau 24) représente les valeurs des concentrations maximales, le taux de croissance, le temps de génération ainsi que la matière sèche correspondant à chaque photopériode. Le meilleur taux de croissance est noté durant la photopériode 24h lumière/0h obscurité avec une valeur de $0,325 \pm 0,006 \text{ J}^{-1}$ à $q_0 = 50 \mu\text{mol}$ de photons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ et une valeur de $0,323 \pm 0,01 \text{ J}^{-1}$ à $100 \mu\text{mol}$ de photons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

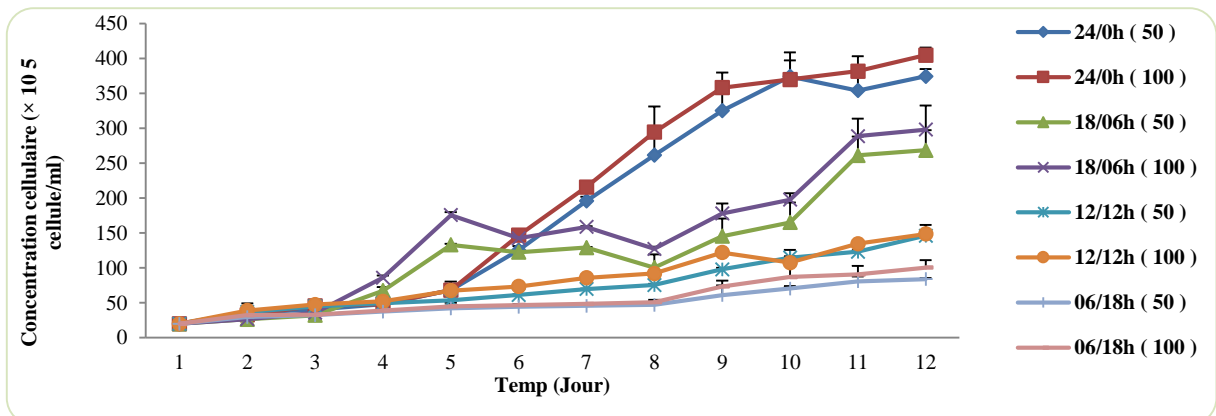


Figure 54 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de *Scenedesmus sp.* cultivée sous différents flux incidents et différentes photopériodes (n=3)

Tableau 24 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche *Scenedesmus sp.* cultivée sous différents flux incidents et différentes photopériodes (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

Traitements	μ (J^{-1})	G	B M ($\times 10^5$ cellule/ml)	M S (mg/ml)
24h/24h(50)	0,325 \pm 0,006 (a)	2,13	387,33 \pm 11,67	783,57 \pm 23,62
24h/24h(100)	0,323 \pm 0,011 (a)	2,14	410 \pm 8,88	829,43 \pm 17,98
18h/06h(50)	0,233 \pm 0,018 (b)	2,97	268,33 \pm 28,86	542,83 \pm 58,39
18h/06h(100)	0,254 \pm 0,005 (b)	2,72	298 \pm 34,69	610,946 \pm 70,19
12h/12h(50)	0,139 \pm 0,003 (c)	4,98	84 \pm 6,92	169,93 \pm 14,01
12h/12h(100)	0,158 \pm 0,005 (c)	4,38	100,33 \pm 13,20	191,17 \pm 24,31
06h/18h(50)	0,193 \pm 0,003 (c)	3,59	100,33 \pm 13,20	295,35 \pm 2,86
06h/18h(100)	0,183 \pm 0,04 (c)	3,78	148,5 \pm 10,60	300,41 \pm 21,45

La figure 55 exprime la valeur en pourcentage des protéines, carbohydrates et celle des lipides sous différentes intensités lumineuses et cycles de photopériodes.

Le plus grand pourcentage en protéines ($p \geq 0,05$) correspond à la photopériode de 18h lumière/06h obscurité sous 100 μmol de photons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ avec une valeur de $46,30\% \pm 6,71$ suivie de $44,37\% \pm 4,60$ sous 24h d'illumination. Cette même photopériode et intensité lumineuse permet à la cellule d'accumuler un pourcentage en carbohydrates ($p \geq 0,05$) et lipides ($p \leq 0,05$) égale à $19,2\% \pm 1,99$ et $20,2\% \pm 0,19$ respectivement (figure 55a).

La figure 55 décrit la concentration des pigments (chlorophylle a, chlorophylle b et caroténoïde) de la souche *Scenedesmus sp.* cultivée sous différentes intensités lumineuses ($q_0 = 50$ et $100 \mu\text{mol}$ de photons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) et différentes photopériodes (24:0, 18:06, 12:12 et 06:18 h L/O).

D'après les histogrammes (figure 55b), nous discernons que la chlorophylle a ($p \leq 0,05$), la chlorophylle b ($p \geq 0,05$) ainsi que les caroténoïdes ($p \leq 0,05$) atteignent un pourcentage maximal de $3,84\% \pm 0,06$, $0,98\% \pm 0,03$ et $0,377\% \pm 0,005$ sous 24h d'éclaircissement et une intensité lumineuse de $100 \mu\text{mol}$ de photons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ respectivement.

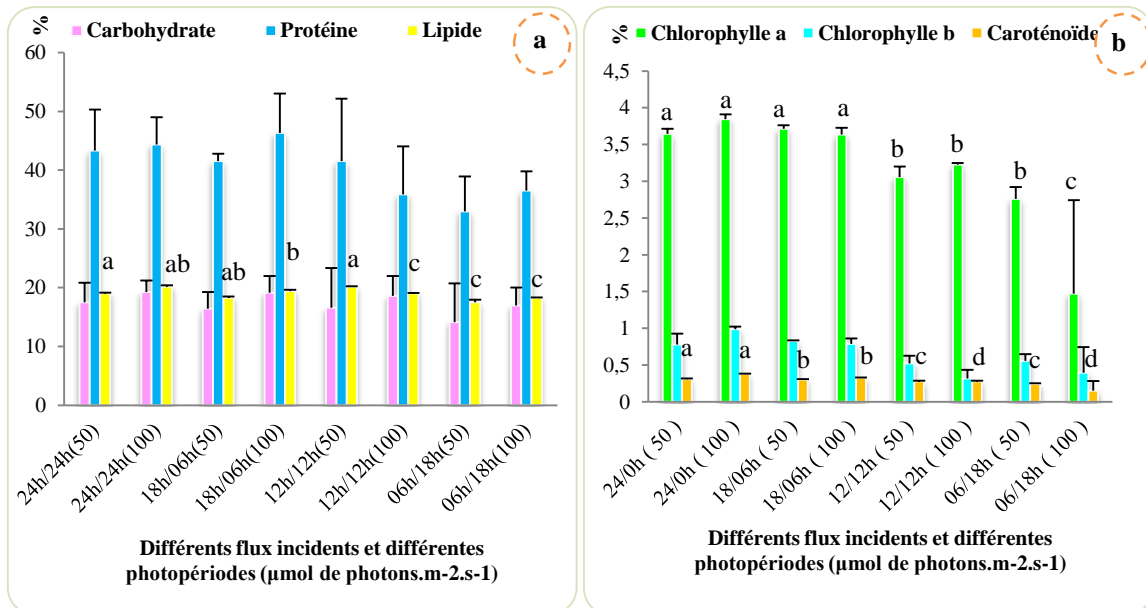


Figure 55 : Variation de la composition biochimique de la souche *Scenedesmus sp.* cultivée sous différents flux incidents et différentes photopériodes (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

III.2.1.3.2. Influence de la température sur la croissance cellulaire et la composition biochimique

Suite à l'étude statistique il s'avère que la température n'exerce aucun effet significatif ($p \leq 0,05$) sur la croissance cellulaire, au début de la période expérimentale, la croissance est lente puis s'accélère à partir de J_6 où une augmentation de la croissance sous les trois températures est observée. La concentration atteint son maximum au bout du 12^{ème} jour de culture ($295,33 \pm 7,23 \times 10^5$ cellule/ml) à 20°C (figure 56).

Cependant elle reste stable de J_9 à J_{12} sous une température égale à 25°C et 30°C, la phase de croissance est suivie d'une légère diminution puis est maintenue dans un état stable jusqu'au 12^{ème} jour.

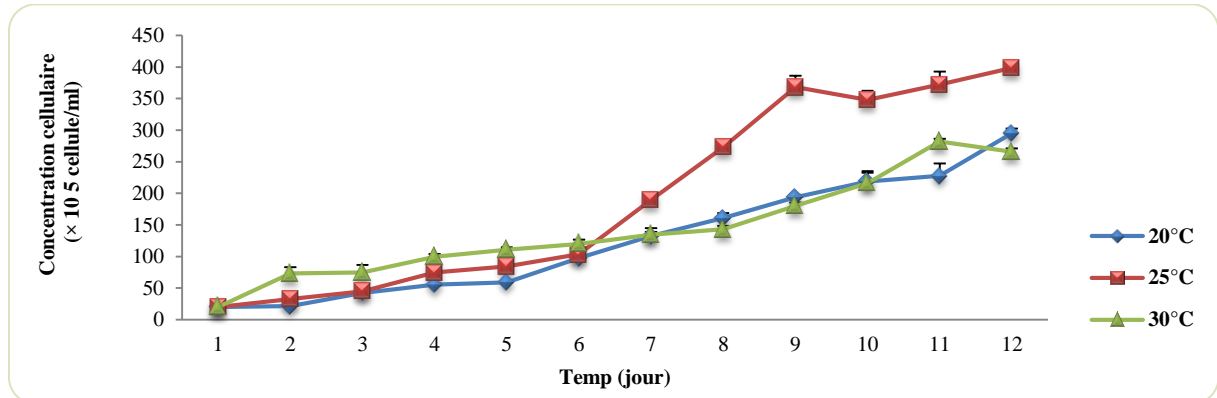


Figure 56 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de *Scenedesmus sp.* cultivée sous différentes températures (n=3)

Tableau 25 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche *Scenedesmus sp.* cultivée sous différentes températures (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

Traitement	μ (J^{-1})	G	BM ($\times 10^5$ cellule/ml)	MS (mg/ml)
20°C	$0,280 \pm 0,01$ (a)	3,57	$295,33 \pm 7,23$	$605,88 \pm 1,43$
25°C	$0,317 \pm 0,004$ (b)	3,15	$398,5 \pm 2,12$	$806,16 \pm 4,29$
30°C	$0,264 \pm 0,008$ (a)	3,78	$265,66 \pm 5,50$	$537,44 \pm 11,14$

L'étude statistique révèle une différence significative ($p \leq 0,05$) entre les différentes températures testées. Une température de 30°C permet d'obtenir les meilleurs pourcentages en protéines et lipides avec des valeurs égales à ($44,13\% \pm 0,16$) et ($21,27\% \pm 12,4$) respectivement, en revanche une culture sous 25°C permet à la cellule d'accumuler $18,29\% \pm 2,26$ de carbohydrates (figure 57a). Les pourcentages en pigments sont aussi significativement ($p \leq 0,05$) influencés par la température utilisée, le meilleur pourcentage en chlorophylle a ($3,70\% \pm 0,15$), chlorophylle b ($1,15\% \pm 0,048$) et caroténoïdes ($0,29\% \pm 0,001$) est enregistré sous 25°C (figure 57b).

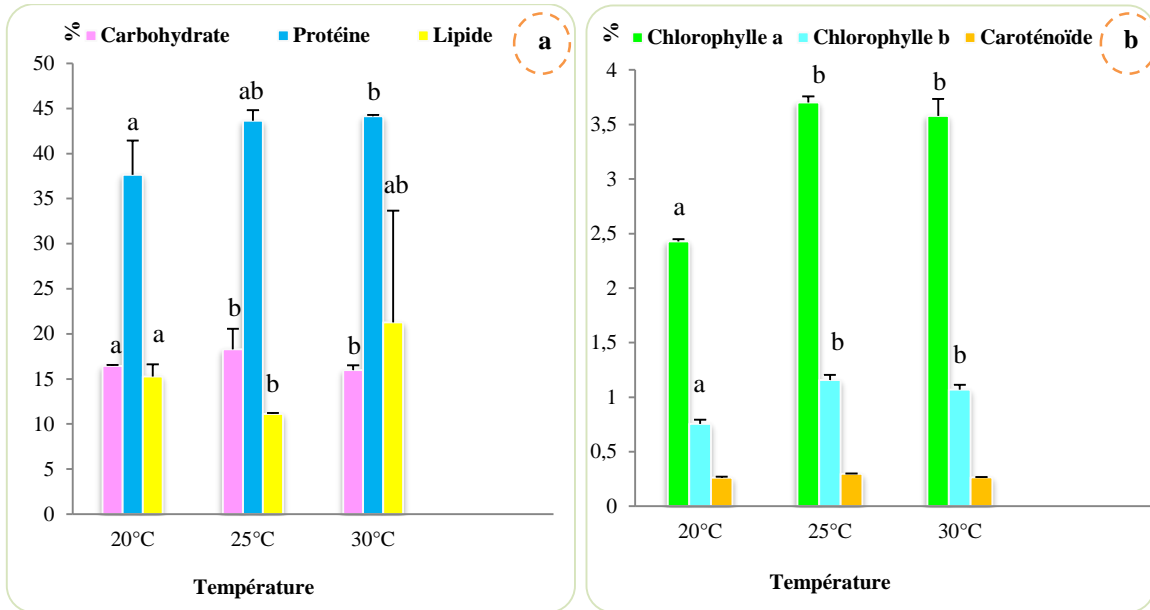


Figure 57 : Variation de la composition biochimique de la souche *Scenedesmus sp.* cultivée sous différentes températures (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

III.2.1.3.3. Influence du pH sur la croissance cellulaire et la composition biochimique

La microalgue verte d'eau douce *Scenedesmus sp.* croît t sous un large intervalle de pH (de 4 à 10). Néanmoins la meilleure croissance est significativement ($p \leq 0,05$) enregistrée a pH8 ($398,5 \pm 2,12 \times 10^5$ cellule/ml) suivie par $234 \pm 5,29 \times 10^5$ cellule/ml sous pH6 (figure 58).

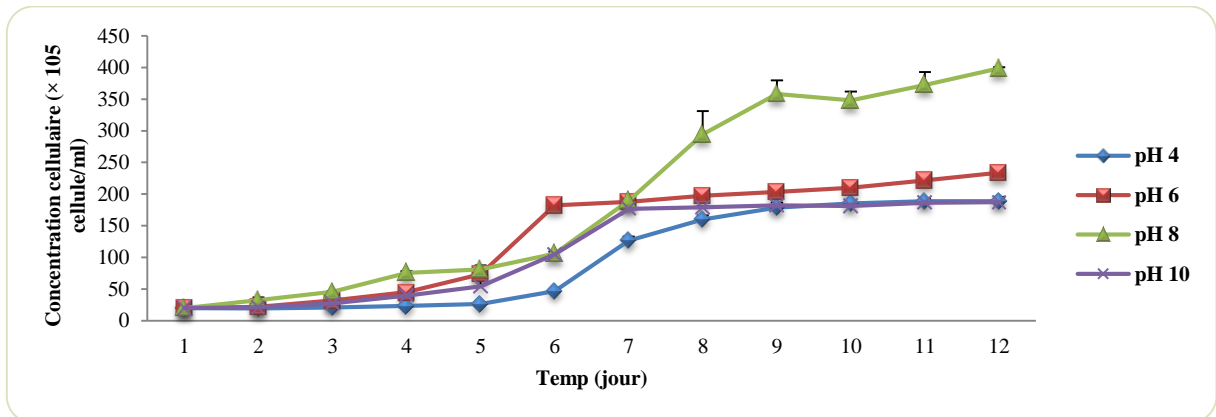


Figure 58 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de *Scenedesmus sp.* cultivée sous différents pH (n=3)

Tableau 26 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche *Scenedesmus sp.* cultivée sous différents pH (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

Traitements	μ (J ⁻¹)	G (J)	BM ($\times 10^5$ cellule/ml)	MS (mg/ml)
10	$0,244 \pm 0,004$ (a)	2,84	$189,33 \pm 0,57$	$383,35 \pm 7,15$
8	$0,317 \pm 0,004$ (b)	2,186	$398,5 \pm 2,12$	$806,15 \pm 4,29$
6	$0,260 \pm 0,002$ (ab)	2,665	234 ± 5.29	$473 \pm 10,70$
4	$0,247 \pm 0.002$ (a)	2,80	191 ± 3	$389,42 \pm 7,15$

Le pH n'exerce aucun effet significatif ($p \geq 0,05$) sur la composition biochimique, néanmoins en termes de valeurs absolues la cellule microalgale *Scenedesmus sp* montre une légère variation sous différents pH avec un maximum en carbohydrates (18,29% \pm 1,62), protéines (43,64% \pm 1,17) et lipides (18,85% \pm 0,4) sous pH8 (figure 59a). Un pH de 8 s'avère être également adéquat pour obtenir les meilleures valeurs en chlorophylle a (3,7% \pm 0,05) et en chlorophylle b (1,15% \pm 0,001), contrairement aux pigments secondaires (caroténoïdes) qui enregistrent la meilleure valeur (0,361% \pm 0,09) sous pH4 (figure 59b).

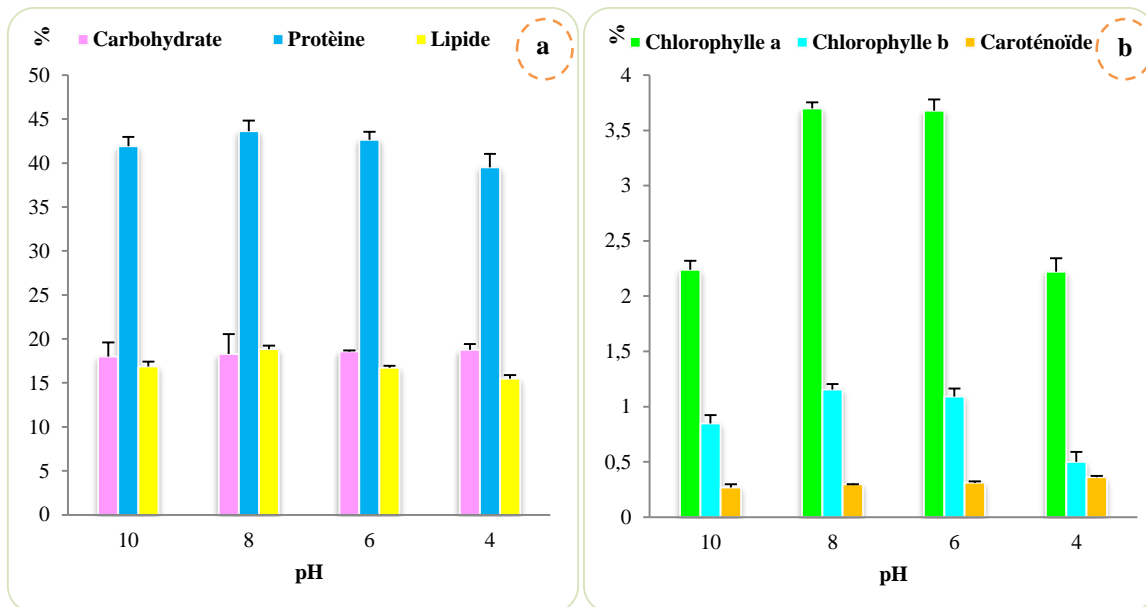


Figure 59 : Variation de la composition biochimique de la souche *Scenedesmus sp.* cultivée sous différents pH (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

III.2.1.3.4. Effet des différentes géométries de photobioréacteur sur la croissance et la composition biochimique

- **Etude de différentes géométries de photobioréacteur (surface spécifique éclairée).**

Suite aux résultats obtenus dans la figure 60 nous constatons que la croissance cellulaire varie significativement ($p \leq 0,05$) en variant la surface spécifique éclairée, elle atteint le meilleur taux de croissance ($0,239 \pm 0,002 \text{ J}^{-1}$) sous $0,2 \text{ m}^{-1}$ avec une matière sèche égale à $383,69 \pm 17,67 \text{ mg/l}$ (tableau 26). En effet la croissance diminue quand on diminue la surface spécifique éclairée.

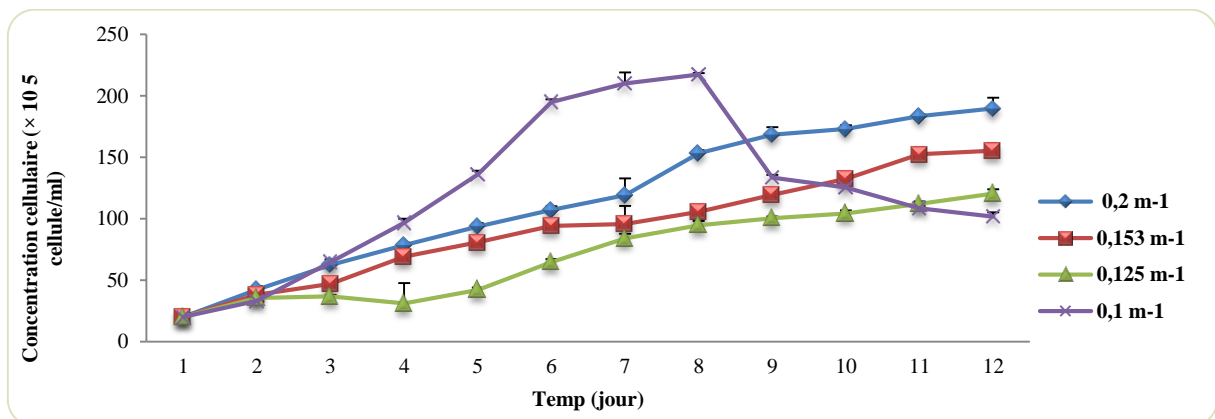


Figure 60 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de *Scenedesmus sp.* selon la surface spécifique éclairée (n=3)

Tableau 27 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que la matière sèche (MS) de la souche *Scenedesmus sp.* cultivée sous différentes surfaces spécifiques éclairées (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

Traitements	μ (J^{-1})	G	BM ($\times 10^5$ cellule/ml)	MS (mg/l)
0,2 m⁻¹	0,239 \pm 0,002 (a)	4,18	189,66 \pm 8,73	383,69 \pm 17,67
0,153 m⁻¹	0,209 \pm 0,002 (b)	4,78	155,33 \pm 6,11	312,23 \pm 12,36
0,125 m⁻¹	0,203 \pm 0,003 (c)	4,92	125,33 \pm 3,05	254,54 \pm 6,18
0,1 m⁻¹	0,184 \pm 0,002 (d)	5,43	120,33 \pm 2,51	241,77 \pm 5,09

Les composants cellulaires de *Scenedesmus sp.* varient ($p \leq 0,05$) en variant la valeur de la surface spécifique éclairée (figure 61a). De ce fait nous notons une augmentation des pourcentages des composants biochimiques sous 0,2 m⁻¹ de surface spécifique éclairée ((19,58% \pm 0,96) de carbohydrates ($p \geq 0,05$), (44,52% \pm 0,3) de protéines ($p \geq 0,05$) et (20,38% \pm 0,36) de lipides ($p \leq 0,05$)). De même pour la chlorophylle a qui enregistre des valeurs égales à (3,87% \pm 0,006) ($p \leq 0,05$), la chlorophylle b (1,05% \pm 0,01) ($p \leq 0,05$) ainsi que les caroténoïdes ($p \leq 0,05$) (0,33% \pm 0,002) (figure 61b).

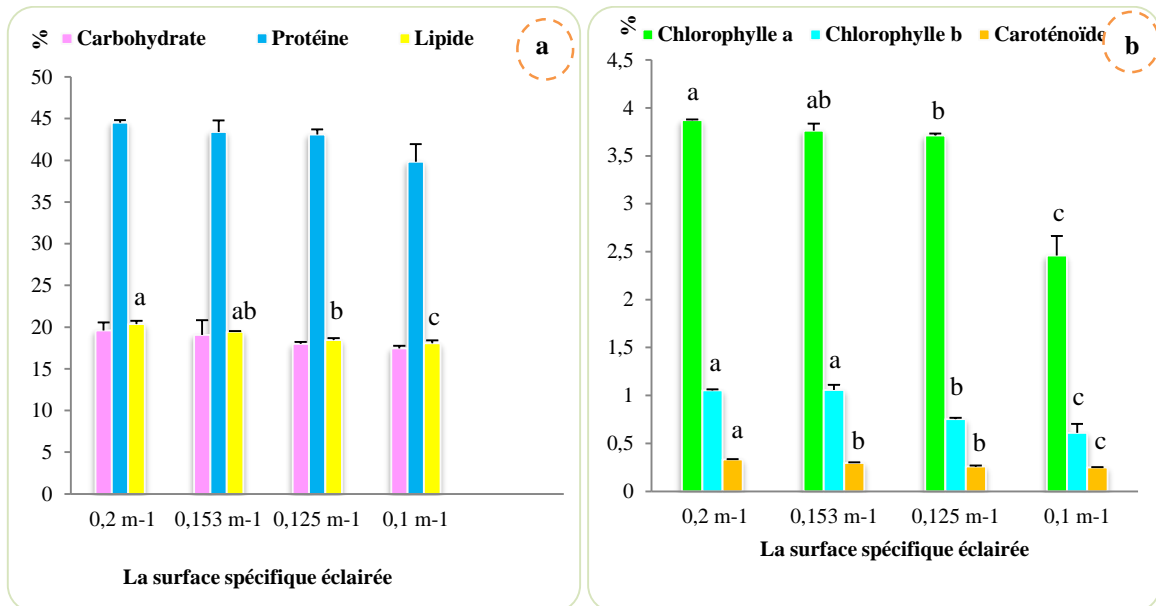


Figure 61 : Variation de la composition biochimique de la souche *Scenedesmus sp.* cultivée sous différentes surfaces spécifiques éclairées, les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

- **Elaboration et test d'un système de culture (système de culture de type plat) à l'échelle pilote**

La figure 62 ainsi que le tableau 28 mettent en évidence que le potentiel du système de culture de type plat a amélioré significativement ($p \leq 0,05$) la croissance cellulaire (taux de croissance), en effet cette dernière passe de 0,317 $J^{-1} \pm 0,004$ sous miniphotobioreacteur cylindrique à 0,327 $J^{-1} \pm 0,0005$. Néanmoins nous observons une similitude dans leur schéma d'évolution.

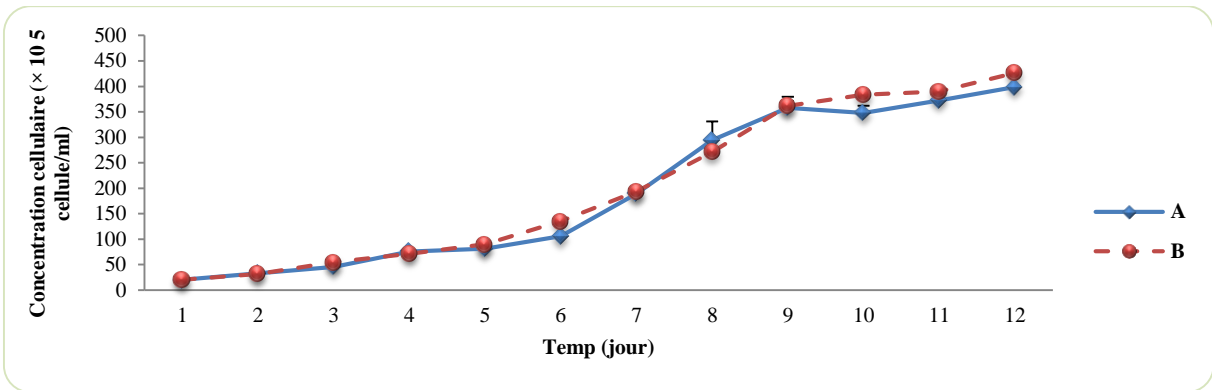


Figure 62 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de *Scenedesmus sp.* cultivée dans deux systèmes de culture distincts (A: miniphotobioacteur cylindrique), (B: système de culture de type plat) (n=3)

Tableau 28 : Détermination du taux de croissance maximale (μM), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche *Scenedesmus sp.* cultivée dans deux systèmes de culture distincts (A : miniphotobioacteur cylindrique), (B : système de culture de type plat) (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

Traitements	μM (J^{-1})	G (J)	BM ($\times 10^5$ cellule/ml)	MS (mg/l)
A	$0,317 \pm 0,004$ (a)	2,186	$398,5 \pm 2,12$	$806,15 \pm 4,29$
B	$0,327 \pm 0,0005$ (b)	2,119	$426,66 \pm 5,85$	$858,76 \pm 12,87$

Après analyse statistique (ANOVA 1), aucune différence significative ($p \geq 0,05$) n'est enregistrée quel que soit le système de culture utilisé.

Toutefois en termes de valeurs absolues nous constatons que le système plat permet à la cellule de *Scenedesmus sp.* d'accumuler des pourcentages plus élevés en carbohydrates (17,92% \pm 0,12) et lipides (19,54% \pm 0,64). En revanche les pourcentages en pigments sont significativement ($p \leq 0,05$) plus importants (chlorophylle a (5,6% \pm 0,054) et caroténoïdes (0,49% \pm 0,001)) (figure 63b).

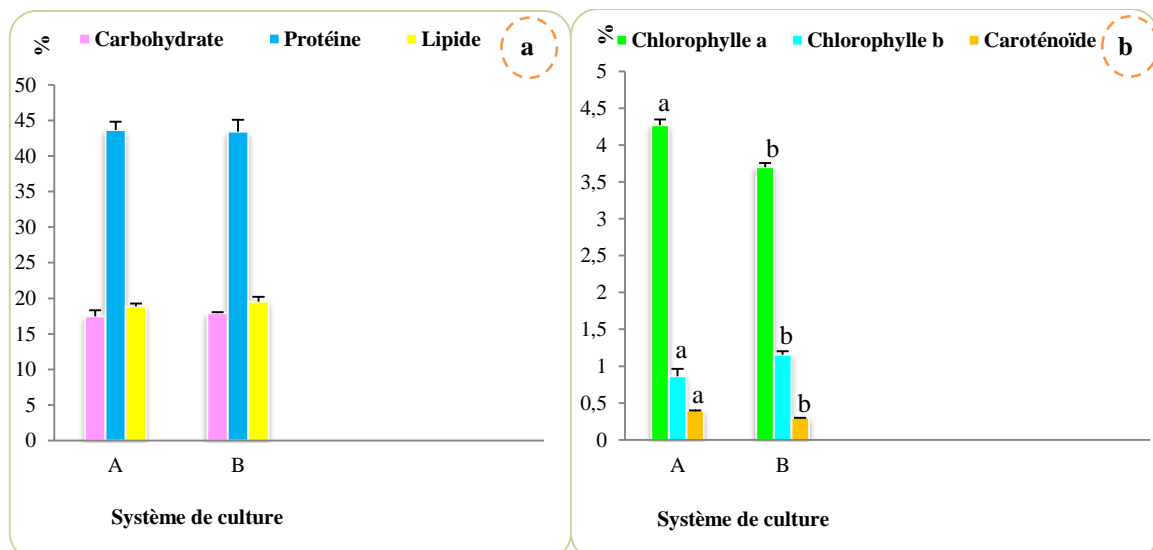


Figure 63 : Variation de la composition biochimique de la souche *Scenedesmus sp* cultivée dans deux systèmes de culture distincts (A : miniphotobioacteur cylindrique), (B : système de culture de type plat) (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

III.2.2. Paramètres biochimiques

III.2.2.1. *Nannochloropsis gaditana*

III.2.2.1.1. Influence de la concentration en bicarbonate de sodium sur la croissance cellulaire et la composition biochimique

Au moment de l'inoculation, la densité cellulaire de notre culture était de 20×10^5 cellules par ml, puis elle augmente de façon significative ($p \leq 0,05$) pour atteindre une valeur de 491 ± 10^5 cellules (tableau 29) sous une culture supplémentée de 2g/l (23,81 mM) de bicarbonate de sodium et enregistre donc le meilleur taux de croissance ($0,323 \pm 0,01 \text{ J}^{-1}$) ($p \leq 0,05$).

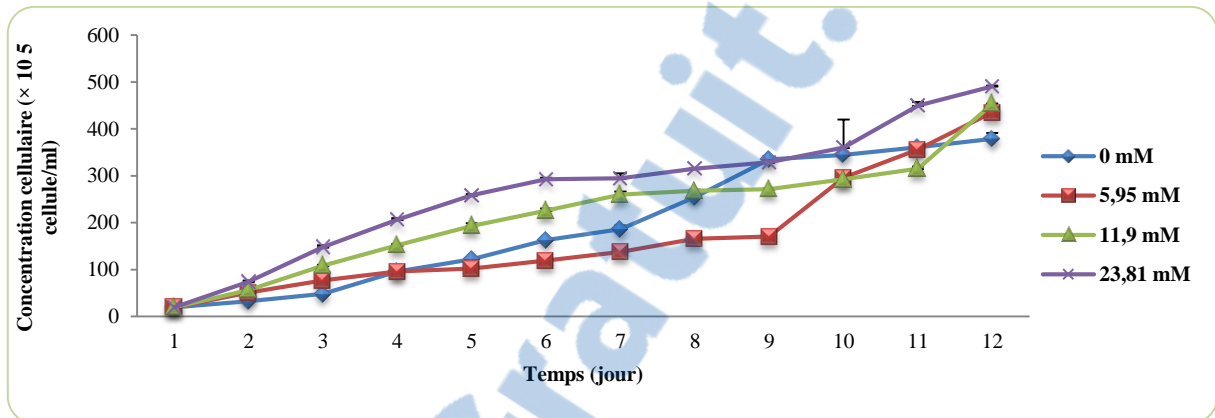


Figure 64 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de *N. gaditana* cultivée sous différentes concentrations en bicarbonate de sodium (n=3)

Tableau 29 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche *N. gaditana* cultivée sous différentes concentrations de bicarbonate de sodium (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

Traitements	μ (J^{-1})	G (J)	BM ($\times 10^5$ cellule/ml)	MS (mg/l)
0 mM	$0,316 \pm 0,001$ (a)	3,16	$362,33 \pm 17$	$1317,86 \pm 61,86$
5,95 mM	$0,299 \pm 0,001$ (a)	3,34	$435,33 \pm 5,03$	$1583,30 \pm 18,30$
11,9 mM	$0,297 \pm 0,0005$ (a)	3,36	$453,33 \pm 1,15$	$164877 \pm 4,19$
23,81 mM	$0,323 \pm 0,01$ (b)	3,09	491 ± 1	$1785,76 \pm 3,63$

La supplémentation en bicarbonate de sodium joue un effet significativement positif ($p \leq 0,05$) sur la composition biochimique interne en augmentant les pourcentages de tous ses composants ($16,92\% \pm 0,82$) de carbohydrates, ($36,07\% \pm 4,43$) de protéines et ($37,8\% \pm 0,12$) de lipides (figure 65a) ainsi que celles des pigments ($4,56\% \pm 0,0005$) de chlorophylle a et ($0,331\% \pm 0,006$) de caroténoïdes ($p \leq 0,05$) (figure 65b).

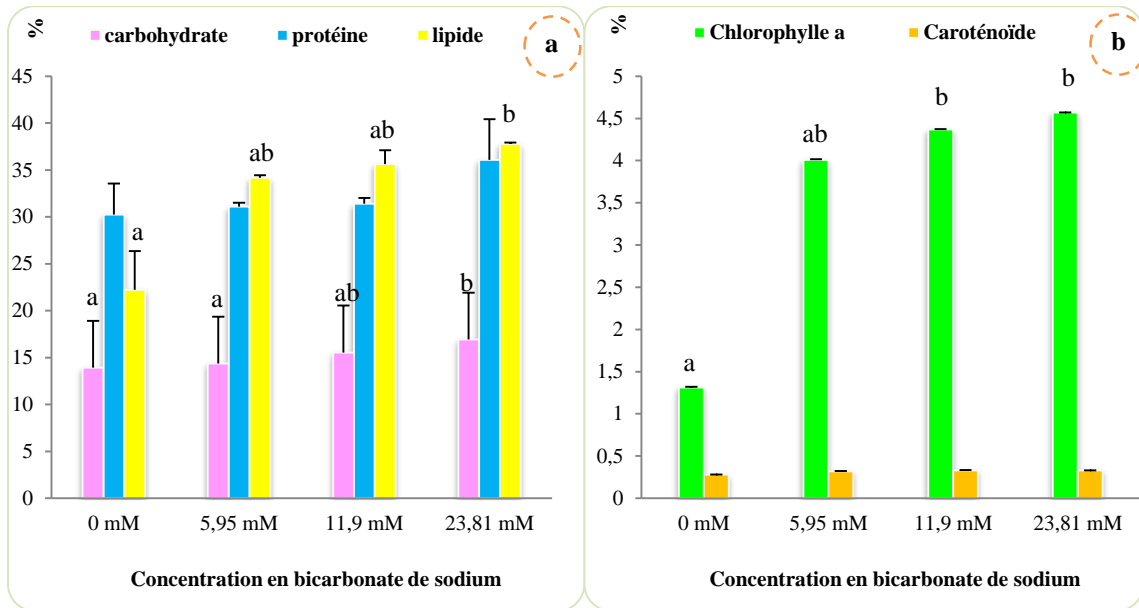


Figure 65 : Variation de la composition biochimique de la souche *N. gaditana* cultivée sous différentes concentrations en bicarbonate de sodium (n=3)

III.2.2.1.2. Influence de différentes sources et concentrations d'azote sur la croissance cellulaire et la composition biochimique

- **Étude de la croissance et de la composition biochimique sous différentes sources d'azote**

La figure 66 montre l'effet significatif ($p \leq 0,05$) des différentes sources d'azote sur la croissance de la souche marine *Nannchloropsis gaditana*.

Au début de la période expérimentale la croissance cellulaire de *N. gaditana* est faible et est maintenue dans un état stable de J_1 à J_2 et ce pour toutes les sources d'azote avec une phase de latence plus longue (3 jours) pour CH_4N_2O .

Les valeurs moyennes des concentrations cellulaires maximales varient de 379 à 426,5 millions cellules/ml, quelle que soit la source d'azote utilisée *N. gaditana* révèle une bonne croissance avec une préférence significative ($p \leq 0,05$) pour le chlorure d'ammonium ($0,327 \pm 0,01 \text{ j}^{-1}$) (tableau 30).

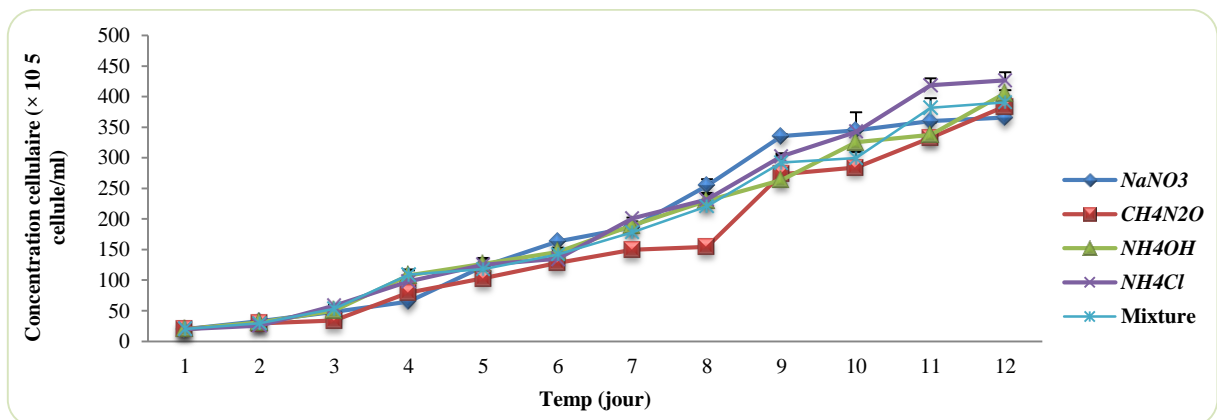


Figure 66 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de *N. gaditana* cultivée sous différentes sources d'azote (n=3)

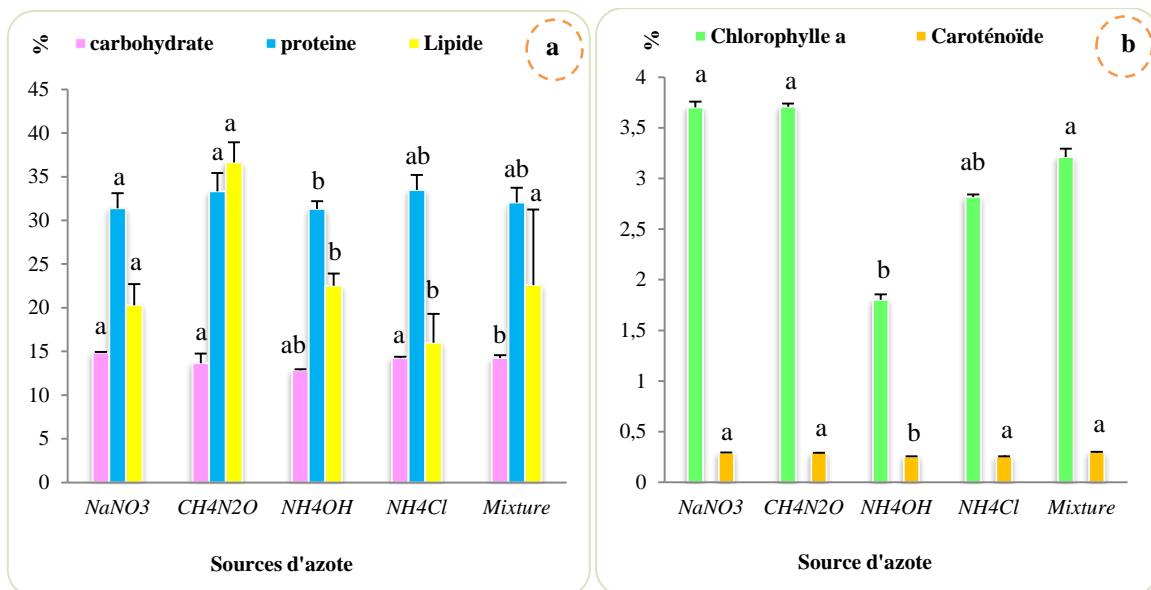
Tableau 30 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximal (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche *N gaditana* cultivée sous différentes sources d'azote (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

Traitements	μ (J ⁻¹)	G (J)	B M ($\times 10^5$ cellule/ml)	MS (mg/l)
<i>NaNO₃</i>	0,246 \pm 0,002 (a)	3,35	292,5 \pm 21,16	1063,82 \pm 23,14
<i>CH₄N₂O</i>	0,262 \pm 0,005 (a)	3,34	376 \pm 21,66	1367,51 \pm 48,86
<i>NH₄OH</i>	0,273 \pm 0,0007 (ab)	3,3	420,5 \pm 13,43	1529,35 \pm 48,86
<i>NH₄Cl</i>	0,278 \pm 0,01 (ab)	3,05	405,33 \pm 5,03	1472,98 \pm 25,17
Mixture	0,270 \pm 0,003 (a)	3,31	412,5 \pm 3,53	1500,26 \pm 12,85

L'analyse statistique (ANOVA 1) révèle un effet significatif ($p \leq 0,05$) de la source d'azote sur la composition biochimique de la microalgue marine.

Le *NaNO₃*, le *NH₄Cl* et l'urée permettent d'obtenir les meilleurs pourcentages en carbohydrates (14,85% \pm 0,08), protéines (33,49% \pm 1,7) et lipides (36,63% \pm 2,3) comme illustré dans la figure (67a).

Le *NH₄Cl* s'avère être la source d'azote la plus adéquate pour la production du plus grand pourcentage en pigments chez la microalgue *N gaditana* avec des valeurs égales à 3,64% \pm 0,006 en chlorophylle a et 0,250% \pm 0,018 en chlorophylle b.



- **Étude de la croissance et la composition biochimique sous différentes concentrations d'azote**

Comme suite à la première expérience, l'influence de la limitation en azote sur la croissance des cultures discontinues de la souche a été évaluée. Ainsi, l'évolution temporelle de la concentration cellulaire a été suivie pour les différentes concentrations d'azotes appliquées. En ce qui concerne la biomasse sèche, la figure 68 montre que celle-ci décroît graduellement avec la réduction de la concentration d'azote dans le milieu passant de 665,57 mg/l \pm 6,29 sous 2,20 mM à 1477,83 mg/l \pm 20,03 sous 17,64 mM. De plus la concentration en azote (nitrogène) exerce un effet significatif ($p \leq 0,05$) sur le taux de croissance cellulaire (tableau 31).



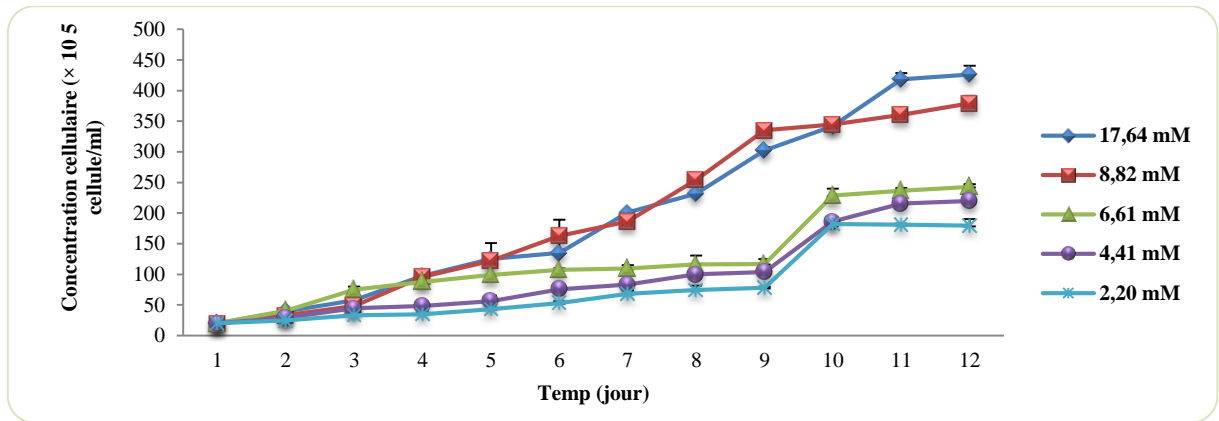


Figure 68 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de *N gaditana* cultivée sous différentes concentrations d'azote (n=3)

Tableau 31 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche *N gaditana* cultivée sous différentes concentrations de nitrogène (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

Traitements	μ (J^{-1})	G	B M ($\times 10^5$ cellule/ml)	M S (mg/l)
17,64 mM	$0,320 \pm 0,002$ (a)	3,125	$406,33 \pm 5,50$	$1477,83 \pm 20,03$
8,82 mM	$0,316 \pm 0,001$ (b)	3,164	$379 \pm 12,48$	$1378,42 \pm 45,42$
6,61 mM	$0,270 \pm 0,003$ (c)	3,703	$243 \pm 4,35$	$883,79 \pm 15,85$
4,41 mM	$0,262 \pm 0,003$ (d)	3,816	220 ± 1	$800,14 \pm 3,63$
2,20 mM	$0,245 \pm 0,001$ (e)	4,081	$183 \pm 1,73$	$665,57 \pm 6,29$

La figure (69a) présente les pourcentages des composants intracellulaires déterminés à l'état stationnaire des cultures discontinues de *N gaditana* sous différentes concentrations d'azote. Comme le montre cette dernière, la baisse de la concentration d'azote de [N]=8,82mM (conditions normales) à [N]=2,20mM déclenche une accumulation significative ($p \leq 0,05$) au niveau des lipides dont le contenu par rapport à la biomasse sèche a augmenté respectivement de 23,25 à 37,34%. Ensuite, la teneur en protéines diminue significativement ($p \leq 0,05$) avec la baisse de la quantité d'azote où un pourcentage de 16,14% est noté pour [N]=2,20mM.

La teneur et la composition cellulaire des pigments ont été ensuite déterminées en régime stationnaire pour chaque concentration d'azote testée. La figure (69b) montre une diminution significative ($p \leq 0,05$) de la concentration en pigments totaux qui coïncide avec la diminution de la concentration d'azote dans le milieu de culture. Ainsi le contenu des pigments totaux baisse fortement de 3,76% dans des conditions optimales de croissance jusqu'à 3,3% sous des conditions de limitation en azote pour une concentration [N]=2,20mM.

Les résultats présentés dans la figure (69b) montrent que le pourcentage des caroténoïdes s'accroît progressivement avec la baisse de la concentration d'azote dans le milieu pour atteindre un maximum sous 2,20mM.

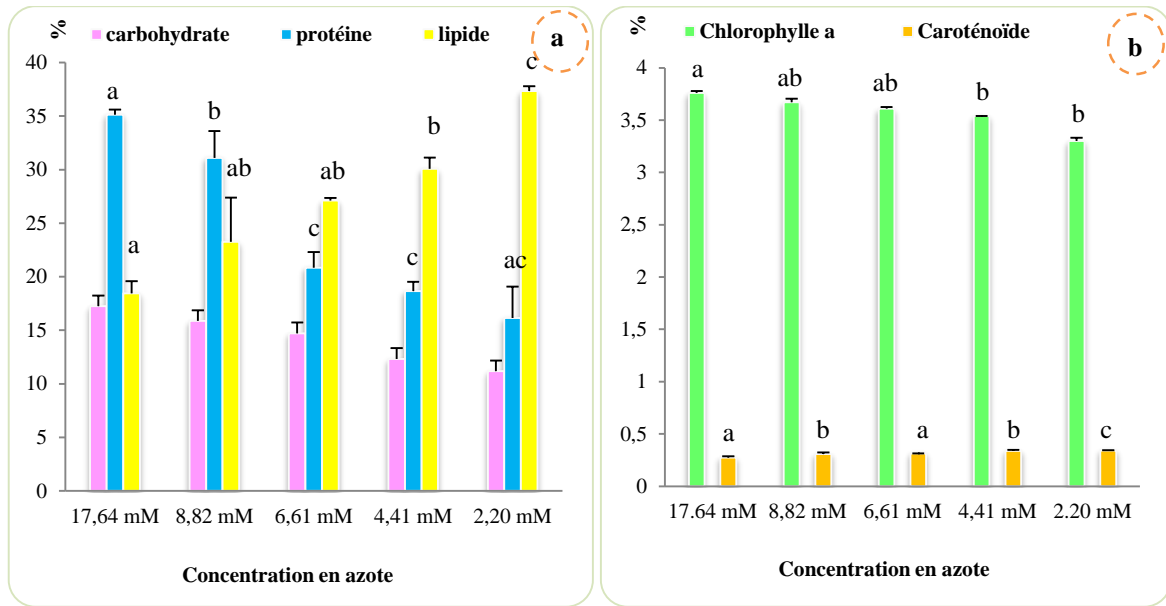


Figure 69 : Variation de la composition biochimique de la souche *N. gaditana* cultivée sous différentes concentrations en azote (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

III.2.2.1.3. Influence de la concentration en phosphate sur la croissance cellulaire et la composition biochimique

La densité cellulaire initiale de notre culture était de 20×10^5 cellule/ml sous toutes les concentrations de phosphate testées.

La phase exponentielle démarre à partir de J₂ avec une évolution progressive jusqu'à J₁₂ où elle atteint sa valeur maximale ($p \leq 0,05$) ($462,33 \pm 1,52 \times 10^5$ cellule/ml, $1681,5 \text{ g/l} \pm 5,55$) sous une concentration égale à [P]=0,726 mM (figure 70).

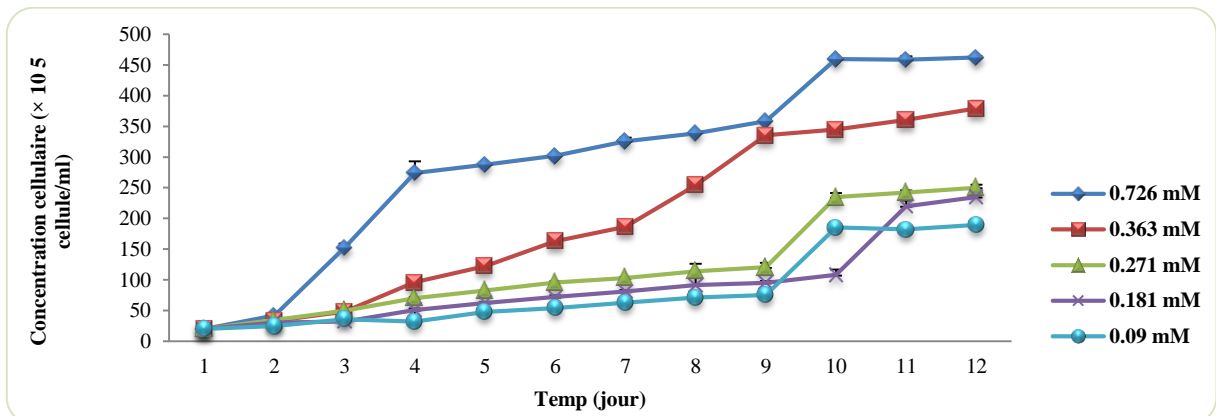


Figure 70 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de *N. gaditana* cultivée sous différentes concentrations en phosphate (n=3)

Tableau 32 : Détermination du taux de croissance maximale (μM), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche *N gaditana* cultivée sous différentes concentrations en phosphate ($n=3$), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

Traitements	μM (J^{-1})	G (J)	BM ($\times 10^5$ cellule/ml)	MS (mg/l)
0,726 mM	$0,347 \pm 0,0005$ (a)	2,88	$462,33 \pm 1,52$	$1681,5 \pm 5,55$
0,363 mM	$0,316 \pm 0,003$ (b)	3,16	$379 \pm 12,48$	$1378,42 \pm 45,42$
0,271 mM	$0,273 \pm 0,003$ (c)	3,66	$249,33 \pm 6,02$	$906,82 \pm 21,92$
0,181 mM	$0,23 \pm 0,011$ (d)	4,43	$232,66 \pm 6,24$	$854,695 \pm 23,38$
0,090 mM	$0,247 \pm 0,002$ (e)	4,04	$189,66 \pm 2,08$	$689,69 \pm 7,57$

L'évolution du pourcentage des différents constituants organiques a été suivie (carbohydrates, protéines, lipides totaux et pigments). Les résultats sont présentés dans les figures (71a) et (71b). Ces résultats confirment l'effet ($p \leq 0,05$) de la carence en phosphate sur la physiologie cellulaire. Sous des conditions de croissance normales, les cellules de *N gaditana* renferment environ $14,93\% \pm 1,57$ de carbohydrates, $34,68\% \pm 3,71$ de protéines et $23,13\% \pm 1,43$ de lipides totaux.

Une carence en phosphate induit une diminution significative ($p \leq 0,05$) du pourcentage en protéines ($22,38\% \pm 3,12$) et celui des carbohydrates ($8,31\% \pm 0,32$) mais stimule ($p \leq 0,05$) en parallèle la production de lipides ($33,25\% \pm 0,84$). La figure 71b montre l'effet positif et significatif ($p \leq 0,05$) d'une carence en phosphate sur le pourcentage en caroténoïdes en augmentant leurs valeurs de ($0,30 \pm 0,007$) à ($0,328 \pm 0,004$). En revanche on note une diminution de pourcentage en chlorophylle a est notée ($3,20 \pm 0,029$) sous $[P]=0,09$ mM (figure 71b).

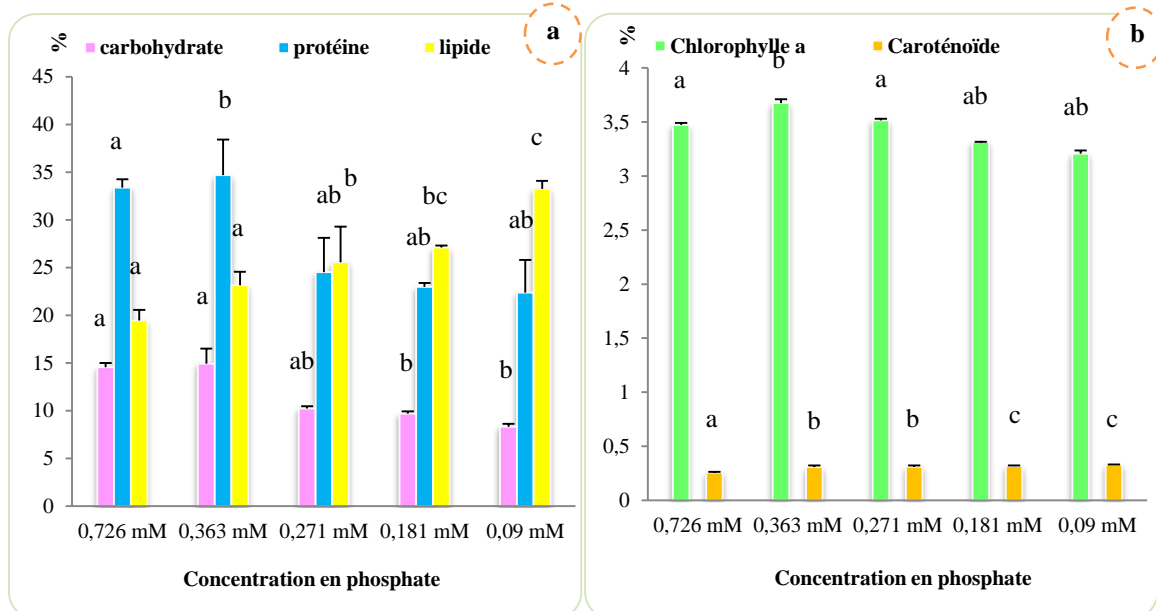


Figure 71 : Variation de la composition biochimique de la souche *N gaditana* cultivée sous différentes concentrations en phosphate ($n=3$), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

III.2.2.2. *Tétranebris brasiliensis*

III.2.2.2.1. Influence de la concentration en bicarbonate de sodium sur la croissance cellulaire et la composition biochimique

Suite aux expériences effectuées nous constatons que la souche *T. brasiliensis* ne favorise pas de suppléments en bicarbonate de sodium et voit donc sa croissance diminuer significativement ($p \leq 0,05$) passant d'un taux de croissance égal à $0,342 \pm 0,003 \text{ J}^{-1}$ sans suppléments à $0,267 \pm 0,01 \text{ j}^{-1}$ en ajoutant 2g/l (23,81 mM) de NaHCO_3 (tableau 33).

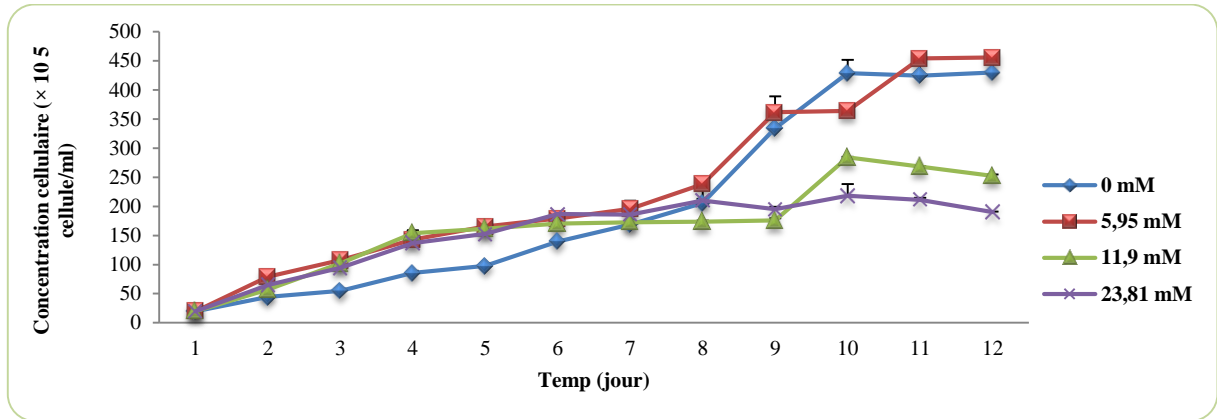


Figure 72 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de *Tétranebris brasiliensis* cultivée sous différentes concentrations en bicarbonate de sodium (n=3)

Tableau 33 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche *Tétranebris brasiliensis* cultivée sous différentes concentrations en bicarbonate de sodium (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

Traitements	μ (J^{-1})	G (J)	BM ($\times 10^5$ cellule/ml)	MS (mg/l)
0 mM	$0,342 \pm 0,003$ (a)	2,92	$425,66 \pm 19,62$	$482,28 \pm 21,73$
5,95 mM	$0,321 \pm 0,001$ (b)	3,11de	$457,66 \pm 1,52$	$506,63 \pm 1,69$
11,9 mM	$0,294 \pm 0,0005$ (c)	3,4	284 ± 1	$314,38 \pm 1,107$
23,81 mM	$0,267 \pm 0,01$ (d)	3,74	$224,66 \pm 19,85$	$240,77 \pm 21,98$

L'analyse statistique révèle un effet significatif ($p \leq 0,05$) des suppléments en carbone sur les pourcentages en carbohydrates, lipides, chlorophylle a et chlorophylle b.

En termes de valeurs absolues nous enregistrons les meilleurs pourcentages en carbohydrates ($25,37\% \pm 3,53$) et lipides ($21,27\% \pm 0,71$) sous la plus grande concentration en bicarbonate de sodium, contrairement aux protéines qui sont plus présentes ($41,27\% \pm 4,71$) sous une culture en milieu F/2 Guillard (0g/l d' NaHCO_3) (figure 73a).

Les pigments adoptent le même comportement que celui des carbohydrates et des lipides en accumulant les meilleurs pourcentages après addition de 2 g/l d' NaHCO_3 ($4,53\% \pm 0,06$ en chlorophylle a, $1,75\% \pm 0,008$ en chlorophylle b et $0,33\% \pm 0,008$ en caroténoïdes) (figure 73b).

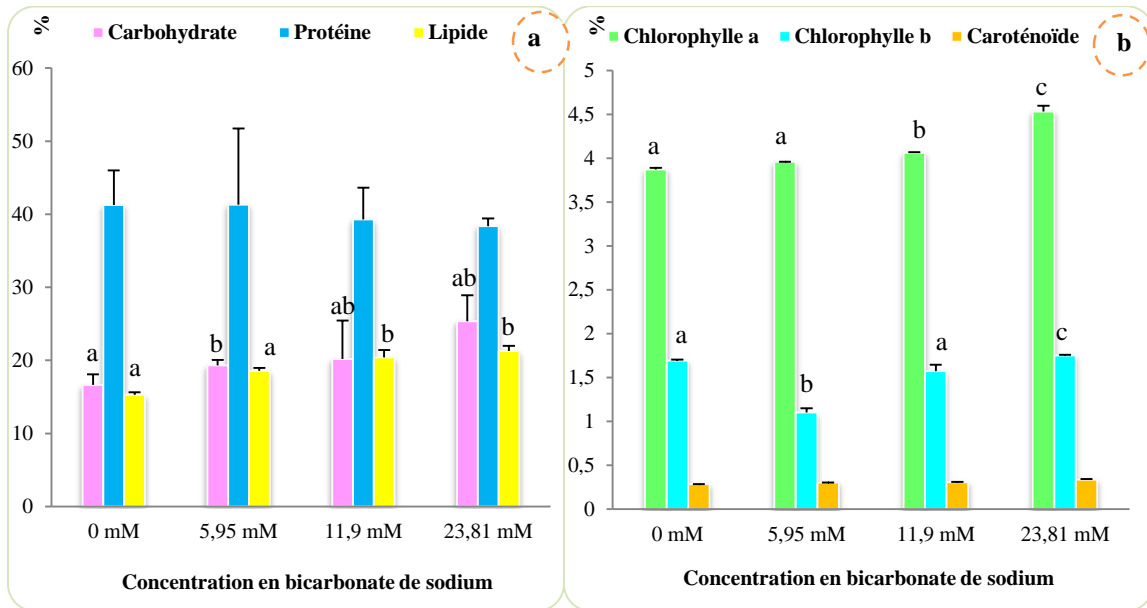


Figure 73 : Variation de la composition biochimique de la souche *Tétranephris brasiliensis* cultivée sous différentes concentrations en bicarbonate de sodium (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

III.2.2.2.2. Influence de différentes sources et concentration d'azote sur la croissance cellulaire et la composition biochimique

- **Étude de la croissance et de la composition biochimique sous différentes sources d'azote**

L'analyse statistique ANOVA 1 montre un effet significatif ($p \leq 0,05$) de la source d'azote sur la croissance cellulaire de la microalgue verte *T brasiliensis*.

Au début de la période expérimentale la concentration cellulaire varie de (20×10^5 à 27×10^5 cellule/ml). Une augmentation progressive de la densité cellulaire sous l'effet de la mixture, de l'urée et du $NaNO_3$ à J₁₂ est estimée à 265×10^5 , 349×10^5 et 430×10^5 cellule/ml respectivement (figure 74).

La croissance s'avère être très lente sous NH_4Cl ($0,041 J^{-1} \pm 0,005$) ainsi que le NH_4OH ($0,225 J^{-1} \pm 0,007$) comme source d'azote (tableau 34).

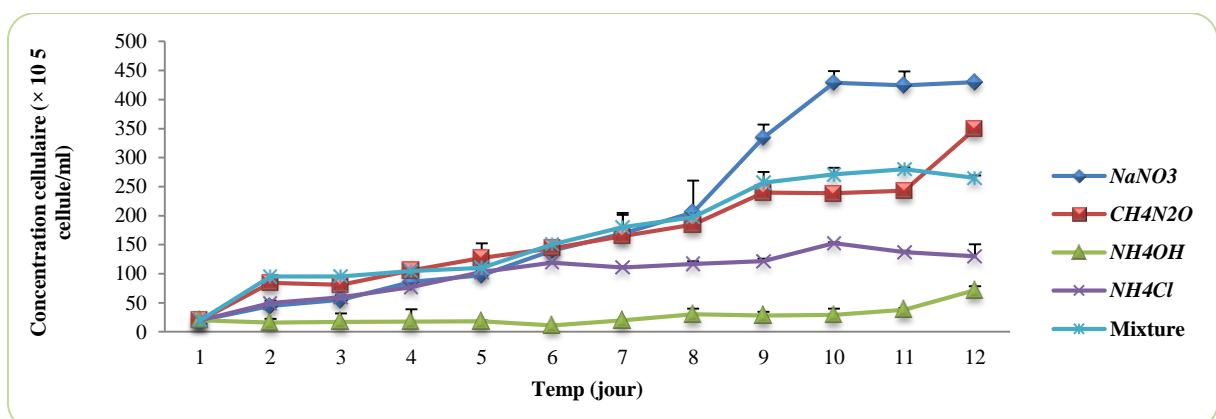


Figure 74 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de *Tétranephris brasiliensis* cultivée sous différentes sources d'azote (n=3)

Tableau 34 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche *Tétranephris brasiliensis* cultivée sous différentes sources d'azote (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

Traitements	μ (J^{-1})	G (J)	BM ($\times 10^5$ cellule/ml)	MS (mg/l)
<i>NaNO₃</i>	$0,276 \pm 0,018$ (a)	3,62	$250 \pm 56,56$	$276,75 \pm 62,62$
<i>CH₄N₂O</i>	$0,214 \pm 0,007$ (b)	4,67	$166 \pm 8,48$	$183,76 \pm 9,39$
<i>NH₄CL</i>	$0,041 \pm 0,004$ (c)	24,39	$71,5 \pm 20,50$	$79,15 \pm 22,70$
<i>NH₄OH</i>	$0,225 \pm 0,007$ (ab)	4,44	$152,5 \pm 10,60$	$168,81 \pm 11,74$
Mixture	$0,238 \pm 0,007$ (ab)	4,2	$182,5 \pm 0,70$	$202,02 \pm 0,78$

Après analyse statistique la source d'azote montre un effet significatif ($p \leq 0,05$) sur les pourcentages en carbohydrates et protéines, la culture à base de *NaNO₃* (source de nitrogène constitutive du milieu F/2 Guillard) présente le pourcentage le plus élevé en carbohydrates ($18,90\% \pm 0,83$) ainsi qu'en protéines ($40,96\% \pm 2,06$), en revanche, comparée aux autres sources, l'urée permet d'obtenir le meilleur pourcentage en lipides ($16,26\% \pm 0,21$) comparé aux autres sources (figure75a).

La source d'azote semble avoir un effet significatif ($p \leq 0,05$) sur le pourcentage en pigments, en effet la mixture permet d'obtenir le meilleur pourcentage en chlorophylle a ($4,33\% \pm 0,117$), le *NaNO₃* pour la chlorophylle b ($1,46\% \pm 0,01$) et le *NH₄OH* pour les caroténoïdes ($0,29\% \pm 0,03$) (figure75b).

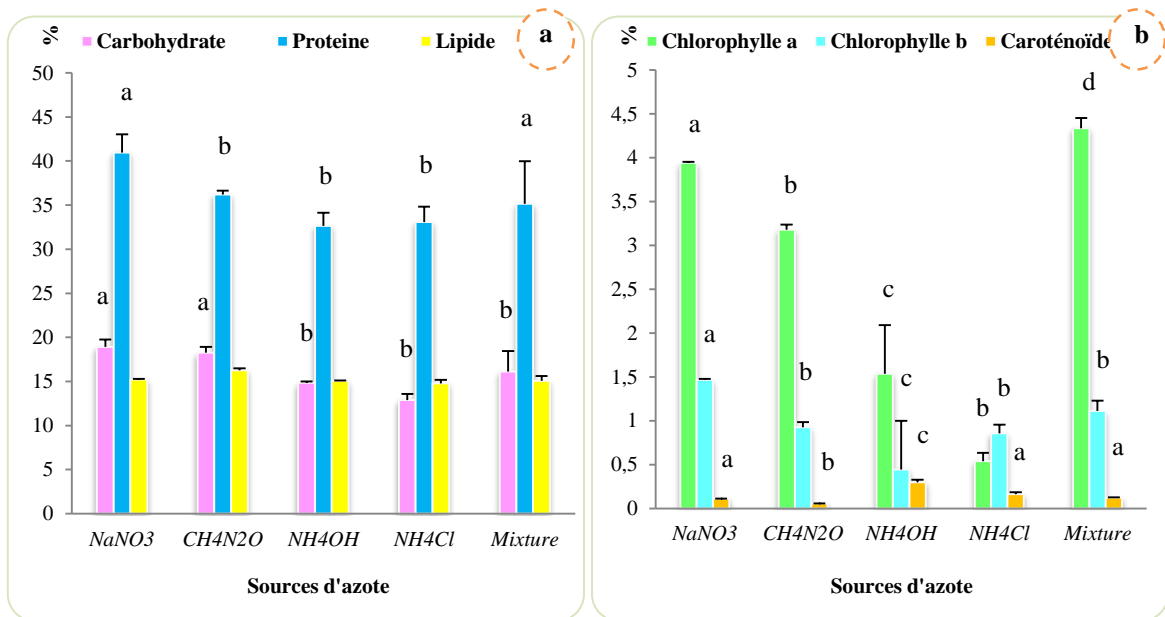


Figure 75 : Variation de la composition biochimique de la souche *Tétranephris brasiliensis* cultivée sous différentes sources d'azote (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

- **Étude de la croissance et de la composition biochimique sous différentes concentrations d'azote.**

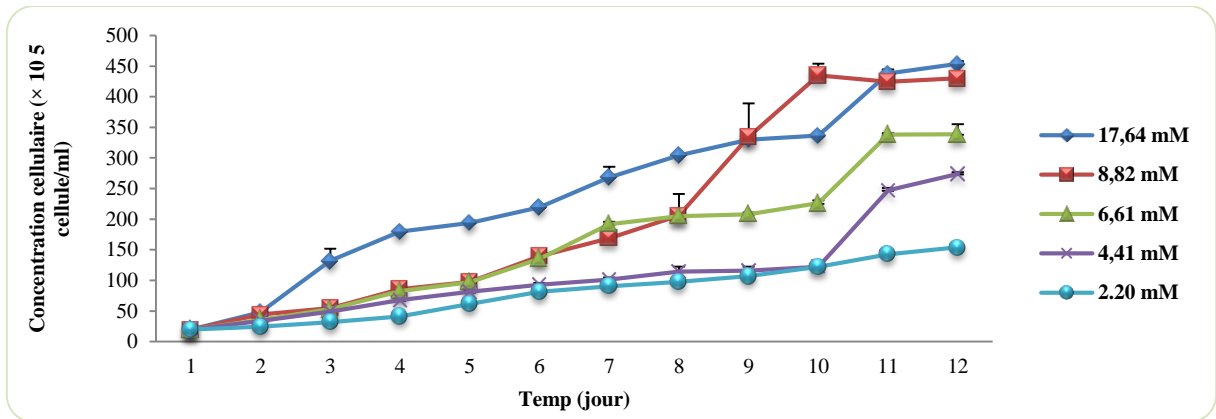


Figure 76 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de *Tétranephris brasiliensis* cultivée sous différentes concentrations d'azote (n=3)

Tableau 35 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche *T brasiliensis* cultivée sous différentes concentrations d'azote (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

Traitements	μ (J^{-1})	G (J)	BM ($\times 10^5$ cellule/ml)	MS (mg/l)
7,64 mM	$0,313 \pm 0,001$ (a)	3,194	$453,66 \pm 4,72$	$502,20 \pm 5,23$
8,82 mM	$0,342 \pm 0,003$ (b)	2,923	$435,66 \pm 19,62$	$482,28 \pm 21,73$
6,61 mM	$0,268 \pm 0,002$ (c)	3,731	$345,33 \pm 6,11$	$382,28 \pm 6,76$
4,41 mM	$0,204 \pm 0,008$ (d)	4,901	$275,66 \pm 3,51$	$303,28 \pm 3,88$
2,20 mM	$0,200 \pm 0,002$ (e)	5	$154 \pm 5,29$	$170,47 \pm 5,85$

Nous avons envisagé d'optimiser la croissance ainsi que la production des composants cellulaires en évaluant l'effet des apports croissants en azote dans le milieu de culture. Les résultats obtenus montrent que plus la concentration en azote du milieu de culture est importante, plus les teneurs en protéines sont significativement ($p \leq 0,05$) élevées ($46,16\% \pm 5,54$) sous $[N]=17,64$ mM (figure 77a), accompagnées d'un décroissement significatif ($p \leq 0,05$) de la teneur en lipides à ($14,65\% \pm 0,3$).

La production de carbohydrates subit quant à elle des variations significatives ($p \leq 0,05$) allant de $21,44\%$ sous $[N]=17,64$ mM $\pm 5,5$ à $13,67 \pm 3,57$ sous $[N]=2,2$ mM. L'augmentation de la concentration en nitrogène permet d'accroître le pourcentage en pigments $3,98\% \pm 0,01$, $2,32\% \pm 0,02$ et $0,268\% \pm 0,017$ pour la chlorophylle a, la chlorophylle b et les caroténoïdes respectivement (figure 77a).

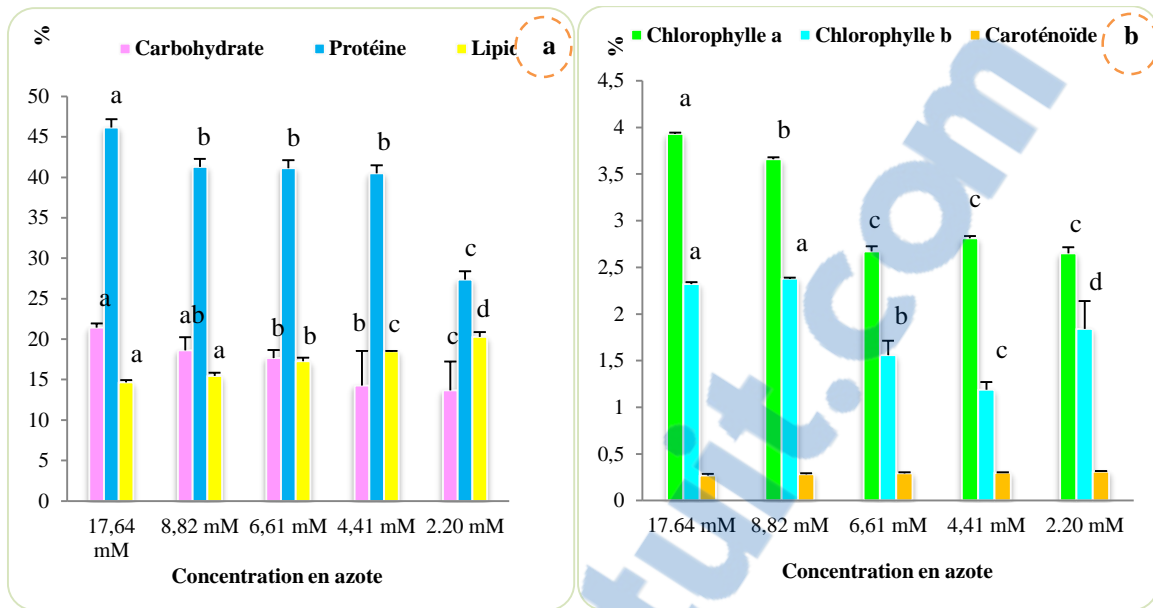


Figure 77 : Variation de la composition biochimique de la souche *Tétranepris brasiliensis* cultivée sous différentes concentrations d'azote (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

III.2.2.2.3. Influence de la concentration en phosphate sur la croissance cellulaire et la composition biochimique

La figure 78 représente les valeurs moyennes de la concentration cellulaire mesurées pour chaque concentration de phosphate, la différence significative ($p \leq 0,05$) étant marquée par des lettres (tableau 36). On observe une augmentation progressive des valeurs de la concentration cellulaire de J_1 à J_{12} avec des valeurs maximales de $451 \pm 10,14 \times 10^5$ cellule/ml sous une concentration de $[P] = 0,726$ mM.

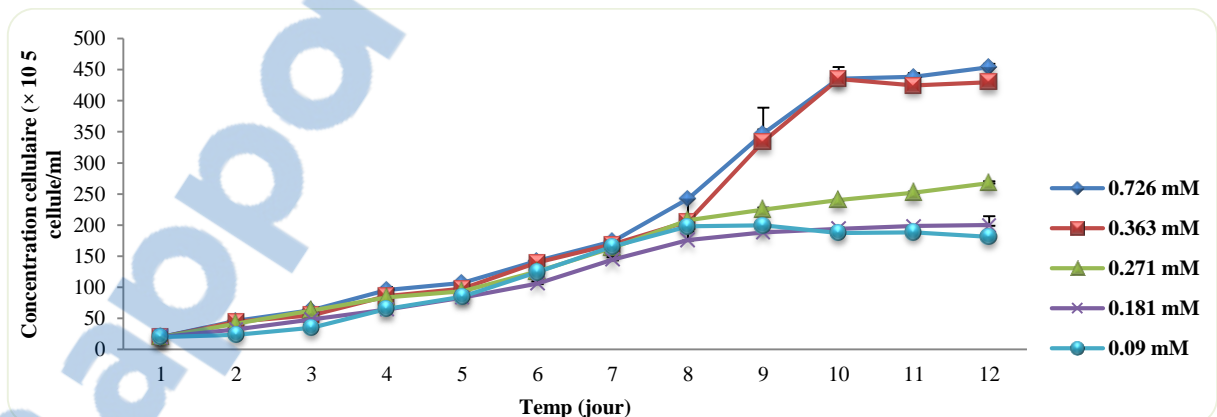


Figure 78 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de *Tétranepris brasiliensis* cultivée sous différentes concentrations en phosphate (n=3)

Tableau 36 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche *Tétranephris brasiliensis* cultivée sous différentes concentrations en phosphate (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

Traitements	μ (J^{-1})	G (J)	B M ($\times 10^5$ cellule/ml)	M S (mg/l)
0,726 mM	$0,342 \pm 0,001$ (a)	2,923	$451 \pm 10,14$	$499,257 \pm 11,23$
0,363 mM	$0,342 \pm 0,003$ (a)	2,923	$435,66 \pm 19,62$	$482,28 \pm 21,73$
0,271 mM	$0,262 \pm 0,02$ (b)	3,816	$267,66 \pm 2,51$	$296,30 \pm 2,78$
0,181 mM	$0,253 \pm 0,001$ (b)	3,95	$199 \pm 10,53$	$220,84 \pm 11,66$
0,090 mM	$0,248 \pm 0,001$ (b)	4,03	$188,33 \pm 1,15$	$208,48 \pm 1,27$

La carence en phosphate agit négativement sur le pourcentage en carbohydrates ($17,60\% \pm 1,149$) ($p \geq 0,05$) et celui sur protéines ($45,65\% \pm 1,27$) ($p \leq 0,05$), contrairement au pourcentage des lipides ($21,49\% \pm 0,03$) qui augmente sous limitation phosphatée (figure 79a).

La composition en pigments et significativement ($p \leq 0,05$) influencée par la concentration en phosphate, les pourcentages en chlorophylle a diminuent de $3,80\% \pm 0,19$ à $2,81\% \pm 0,02$ sous $[P] = 0,09$ Mm, l'effet contraire est enregistré pour les caroténoïdes ($0,316\% \pm 0,13$) (figure 79b).

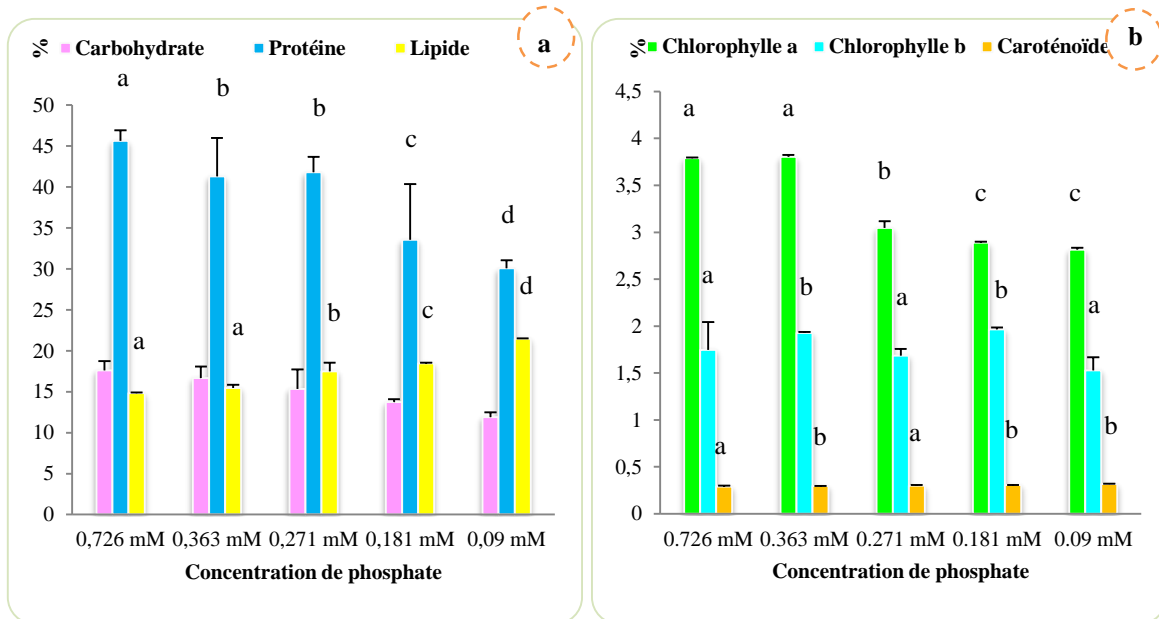


Figure 79 : Variation de la composition biochimique de la souche *Tétranephris brasiliensis* cultivée sous différentes concentrations en phosphate (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

III.2.2.3. *Scenedesmus sp.*

III.2.2.3.1. Influence de différentes concentrations en bicarbonate de sodium sur la croissance cellulaire et la composition biochimique

La souche *Scenedesmus sp.* ne voit pas sa croissance augmenter sous un enrichissement en bicarbonate de sodium passant d'un taux de croissance égal à $0,317 \pm 0,004 \text{ J}^{-1}$ ($806,16 \pm 4,29 \text{ mg/l}$) sans suppléments à $0,200 \pm 0,001 \text{ J}^{-1}$ ($446,07 \pm 9,97 \text{ mg/l}$) en ajoutons 2 g/l de bicarbonate de sodium (tableau 37).

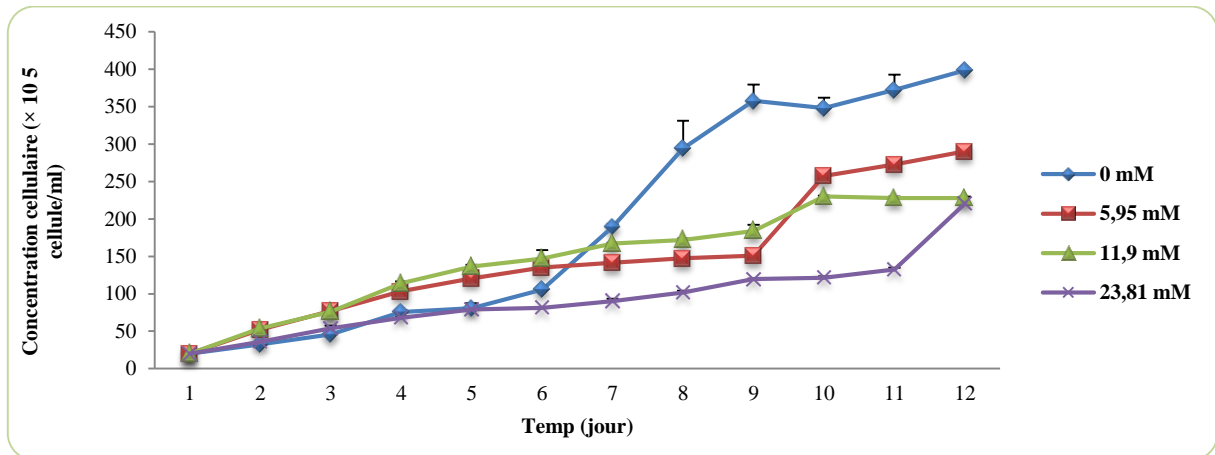


Figure 80 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de *Scenedesmus sp.* cultivée sous différentes concentration en bicarbonate de sodium (n=3)

Tableau 37 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que la matière sèche (MS) de la souche *Scenedesmus sp.* cultivée sous différentes concentration en bicarbonate de sodium (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

Traitements	μ (J^{-1})	G (J)	B M ($\times 10^5$ cellule/ml)	M S (mg/l)
0 mM	$0,317 \pm 0,004$ (a)	3,154	$398,33 \pm 2,12$	$806,16 \pm 4,29$
5,95 mM	$0,283 \pm 0,005$ (a)	3,53	$290,33 \pm 1,52$	$587,34 \pm 3,09$
11,9 mM	$0,271 \pm 0,001$ (b)	3,69	230 ± 2	$465,79 \pm 4,04$
23,81 mM	$0,200 \pm 0,001$ (c)	5	$223,33 \pm 4,93$	$446,07 \pm 9,97$

On enregistre le meilleur pourcentage en carbohydrates ($p \leq 0,05$) ($22,10\% \pm 1,30$) et lipides ($p \leq 0,05$) ($21,08\% \pm 0,59$) sous la plus grande concentration en bicarbonate de sodium (2 g/l) contrairement aux protéines ($p \geq 0,05$) qui sont plus présent ($43,64\% \pm 1,17$) sous une culture en milieu F/2 Guillard (0 g/l bicarbonate de sodium) comme illustré dans la figure (81a).

Le pourcentage en chlorophylle a augmenté au fur et à mesure qu'on augmente la concentration en NaHCO_3 accumulant les meilleurs pourcentages sous addition de 2 g/l ($23,81 \text{ mM}$) ($4,47\% \pm 0,06$). La cellule accumule les pourcentages les plus hauts en caroténoïdes ($0,35\% \pm 0,06$) sous une supplémentation de 1 g/l (figure 81b).

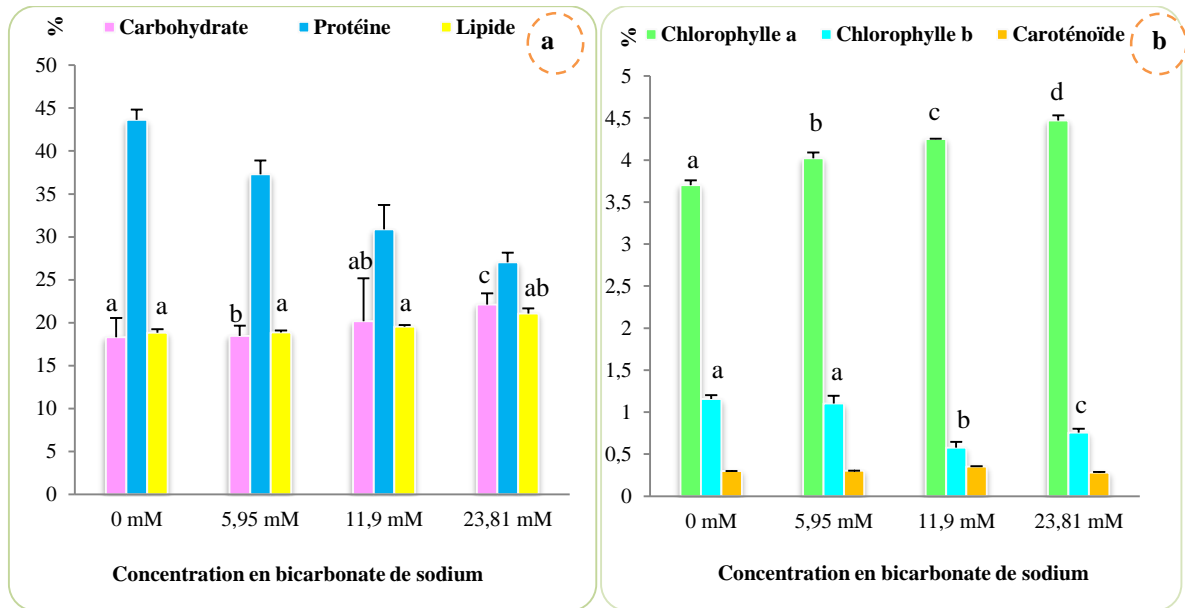


Figure 81 : Variation de la composition biochimique de la souche *Scenedesmus sp.* cultivée sous différentes concentrations en bicarbonate de sodium (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

III.2.2.3.2. Influence de différentes sources et concentration d'azote sur la croissance cellulaire et la composition biochimique

- **Étude de la croissance et de la composition sous différentes sources d'azote**

La densité initiale des cultures est estimée à 20×10^5 cellules/ml, en termes de valeurs absolues la concentration cellulaire augmente pour atteindre un maximum de 85×10^5 , $88,5 \times 10^5$ et $146,5 \times 10^5$ à J₁₀ sous l'effet des trois sources d'azote Mixture, NH_4OH et l'urée respectivement et 272×10^5 cellules/ml pour le $NaNO_3$ à J₁₁ (figure 72). Tandis que la croissance cellulaire est très faible ($p \geq 0,05$) sous l'effet de NH_4Cl avec une valeur maximale de (56×10^5 cellules/ml à J₈).

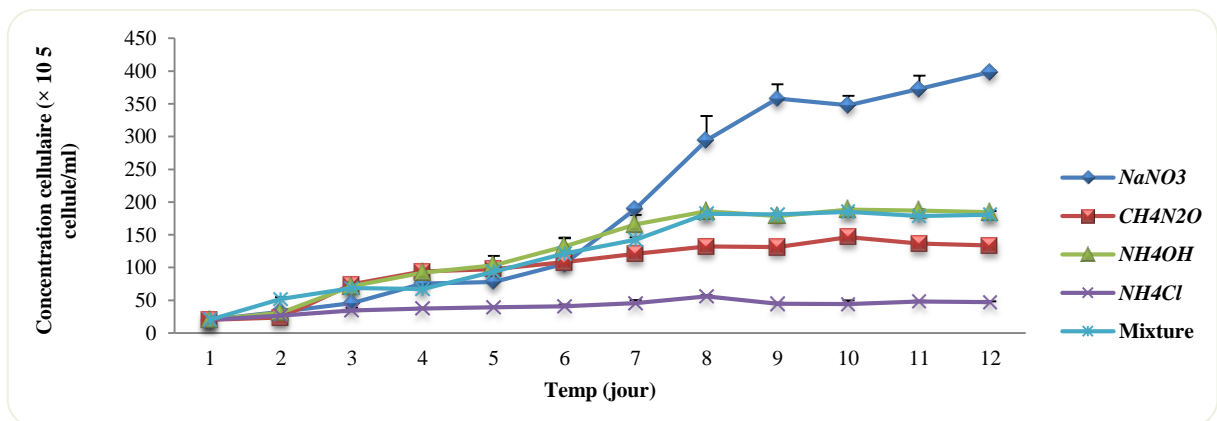


Figure 82 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de *Scenedesmus sp.* cultivée sous différentes sources d'azote (n=3)

Tableau 38 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche *Scenedesmus sp.* cultivée sous différentes source d'azote (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p < 0,05$)

Traitements	μ (J ⁻¹)	G (J)	BM ($\times 10^5$ cellule/ml)	MS (mg/l)
<i>NaNO₃</i>	0,264 \pm 0,02 (a)	3,78	273 \pm 18,83	552,27 \pm 37,19
<i>CH₄N₂O</i>	0,221 \pm 0,001 (b)	4,54	146,5 \pm 2,12	296,36 \pm 4,29
<i>NH₄OH</i>	0,08 \pm 0,01 (c)	12,5	47 \pm 1,41	95,08 \pm 2,86
<i>NH₄Cl</i>	0,16 \pm 0,004 (d)	6,25	86,66 \pm 3,51	179,03 \pm 7,10
Mixture	0,16 \pm 0,001 (d)	6,25	85,66 \pm 1,52	173,30 \pm 3,90

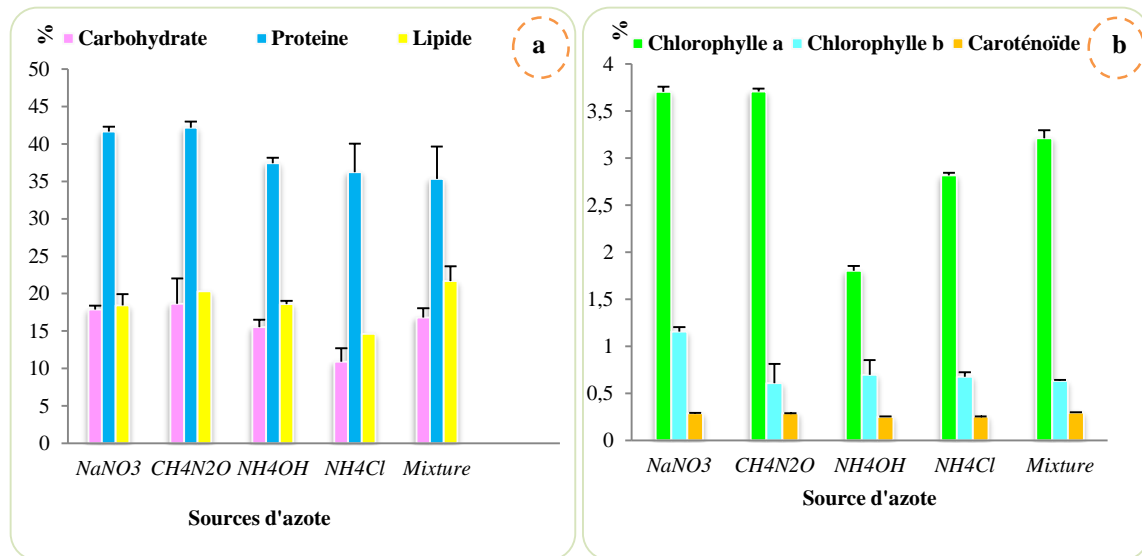


Figure 83 : Variation de la composition biochimique de la souche *Scenedesmus sp.* cultivée sous différentes sources d'azote (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

- **Étude de la croissance cellulaire et la composition biochimique sous différentes concentrations d'azote**

Une fois la source d'azote préférentielle discernée l'influence de la limitation en azote sur la croissance des cultures discontinues de la souche a été évaluée, Ainsi, l'évolution temporelle de la concentration cellulaire a été suivie. La biomasse sèche diminue graduellement ($p \leq 0,05$) avec la réduction de la concentration en azote passant de 835,49 mg/l \pm 8,58 (0,326 \pm 0,0005 J⁻¹) sous [N]=17,64 mM à 395,15 mg/l \pm 7,10 sous [N]= 2,2 mM (0,241 \pm 0,001 J⁻¹) (tableau 39).

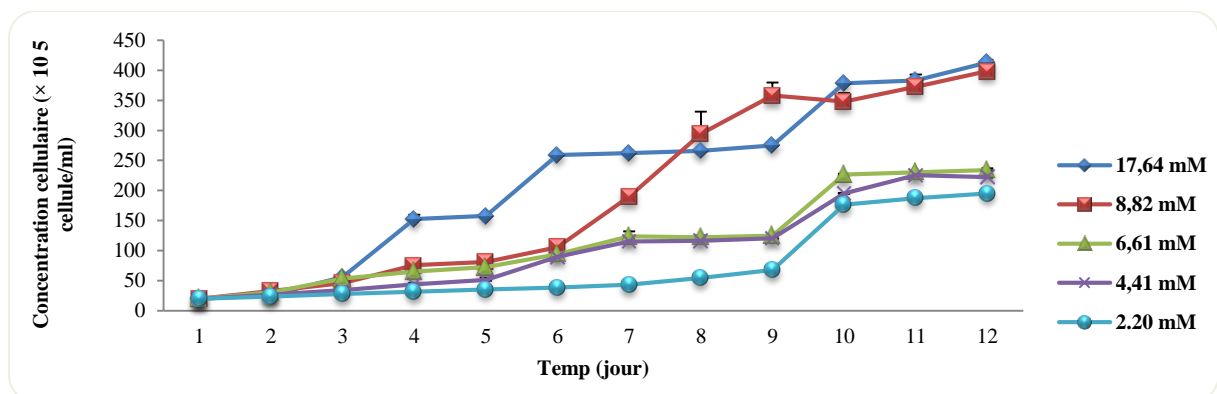


Figure 84: Evolution temporelle de la concentration cellulaire de *Scenedesmus sp.* cultivée sous différentes concentration d'azote (n=3)

Tableau 39 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche *Scenedesmus sp.* cultivée sous différentes concentration d'azote (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

Traitements	μ (J^{-1})	G (J)	BM ($\times 10^5$ cellule/ml)	MS (mg/l)
17,64 mM	$0,326 \pm 0,0005$ (a)	3,06	$413 \pm 4,24$	$835,49 \pm 8,58$
8,82 mM	$0,317 \pm 0,004$ (b)	3,15	$398,5 \pm 2,12$	$806,15 \pm 4,29$
6,61 mM	$0,269 \pm 0,001$ (c)	3,71	$226,33 \pm 1,52$	$457,87 \pm 1,169$
4,41 mM	$0,266 \pm 0,0005$ (c)	3,75	220 ± 33	$446,07 \pm 3,09$
2,20 mM	$0,241 \pm 0,001$ (d)	4,14	$195,33 \pm 3,51$	$395,15 \pm 7,10$

La figure 85 présente le pourcentage des composants intracellulaires déterminé à l'état stationnaire des cultures discontinues de *Scenedesmus sp.* sous différentes concentration d'azote. Comme le montre cette dernière, la réduction de la concentration d'azote de [N]= 8,82 mM (milieu F/2 Guillard) à [N]= 2,20 mM provoque une augmentation significative ($p \leq 0,05$) des pourcentages en lipides et celle des carbohydrates à 23,89% et 24,07% respectivement, en parallèle la teneur en protéines diminue significativement ($p \leq 0,05$) avec la baisse de la quantité d'azote où un pourcentage de 31,49% est noté pour [N]= 2,20mM.

Une forte diminution ($p \leq 0,05$) de la concentration en pigments (chlorophylle a et chlorophylle b) coïncide avec la diminution de la concentration en azote dans le milieu de culture. Ainsi le contenu des pigments baisse ($p \leq 0,05$) considérablement de 3,70% dans des conditions optimales de croissance jusqu'à 1,99% sous des conditions de limitation azotée pour une concentration [N]= 2,20mM.

Les résultats présentés dans la figure 86b montrent que le pourcentage des caroténoïdes s'accroît ($p \leq 0,05$) progressivement avec la baisse de la concentration d'azote dans le milieu pour atteindre un maximum sous 2,20 mM ($0,381\% \pm 0,017$).

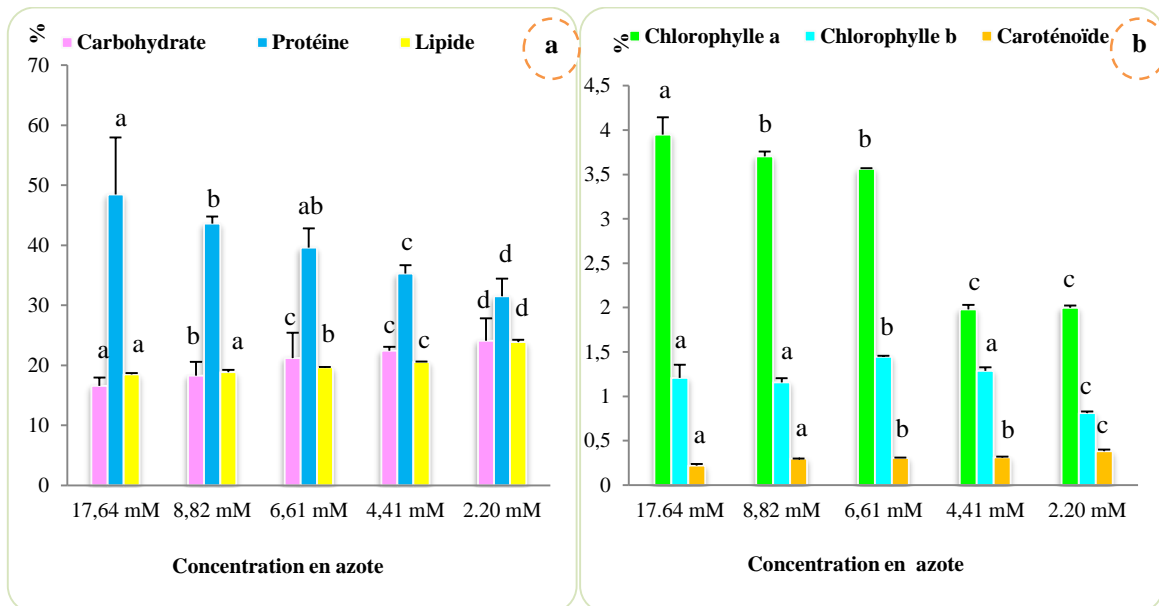


Figure 85 : Variation de la composition biochimique de la souche *Scenedesmus sp.* cultivée sous différentes concentrations d'azote (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

III.2.2.3.3. Influence de la concentration en phosphate sur la croissance cellulaire et la composition biochimique

L'augmentation de la concentration en phosphate ($[P] = 0,726 \text{ mM}$) stimule significativement ($p \leq 0,05$) la croissance cellulaire de la microalgue verte *Scenedesmus sp.* en augmentant sa biomasse de 20 à $423,66 \pm 7,23 (\times 10^5 \text{ cellule/ml})$ au bout de 12 jours de culture, en parallèle une carence en phosphate entraine une diminution significative ($p \leq 0,05$) de la croissance cellulaire ($79,33 \pm 1,15 \times 10^5 \text{ cellule/ml}$) (tableau 40).

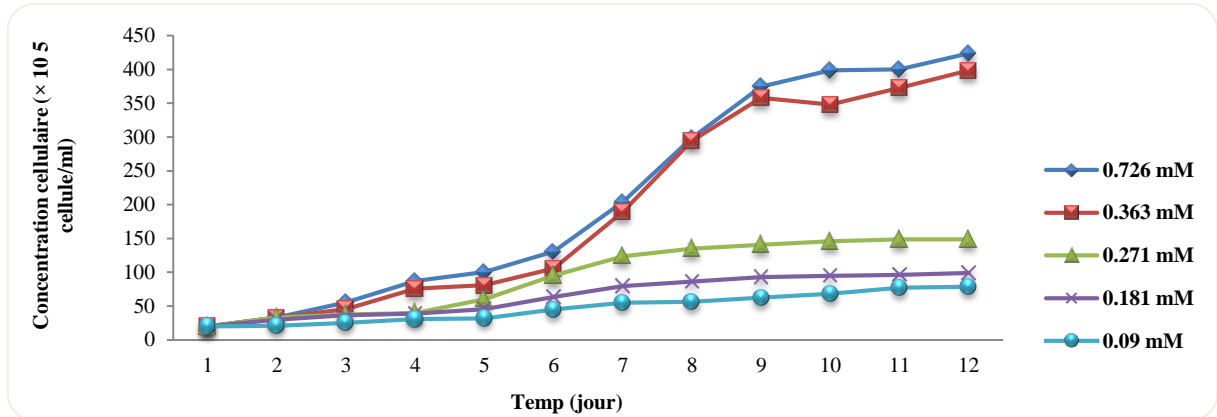


Figure 86 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire de *Scenedesmus sp.* cultivée sous différentes concentrations en phosphate (n=3)

Tableau 40 : Détermination du taux de croissance (μ), du temps de génération (G), de la biomasse maximale (BM) ainsi que de la matière sèche (MS) de la souche *Scenedesmus sp.* cultivée sous différentes concentrations en phosphate (n=3), les taux de croissance suivis par des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

Traitements	μ (J^{-1})	G (J)	BM ($\times 10^5 \text{ cellule/ml}$)	MS (mg/l)
0,726 mM	$0,332 \pm 0,001$ (a)	3,01	$423,66 \pm 7,23$	$857,07 \pm 14,63$
0,363 mM	$0,317 \pm 0,004$ (a)	3,15	$398,5 \pm 2,12$	$806,16 \pm 4,29$
0,271 mM	$0,220 \pm 0,002$ (a)	4,54	150 ± 2	$303,45 \pm 4,046$
0,181 mM	$0,207 \pm 0,006$ (b)	4,83	$97,66 \pm 2,51$	$200 \pm 5,09$
0,090 mM	$0,137 \pm 0,0001$ (c)	7,29	$79,33 \pm 1,15$	$160,49 \pm 2,33$

Nous observons une diminution non significative ($p \geq 0,05$) du pourcentage des carbohydrates ($16,90\% \pm 0,05$) et significative ($p \leq 0,05$) de celui des protéines ($35,08\% \pm 3,70$) en corrélation avec la diminution en concentration de phosphate, l'effet contraire est observé pour les lipides ($21,72\% \pm 0,01$) (figure 87a).

Les pigments (chlorophylle a et chlorophylle b) adoptent le même comportement que celui des protéines, on voit donc leurs croissances augmentées significativement ($p \leq 0,05$) quand on augmente la concentration en phosphate $[P] = 0,726 \text{ mM}$ ($4,34\% \pm 0,04$ et $1,21\% \pm 0,002$ respectivement), l'effet contraire est observé pour les caroténoïdes dont la croissance augmente d'une manière non significative ($p \geq 0,05$) en diminuant la concentration en phosphate $[P] = 0,09 \text{ mM}$ ($0,36\% \pm 0,07$) (figure 87b).

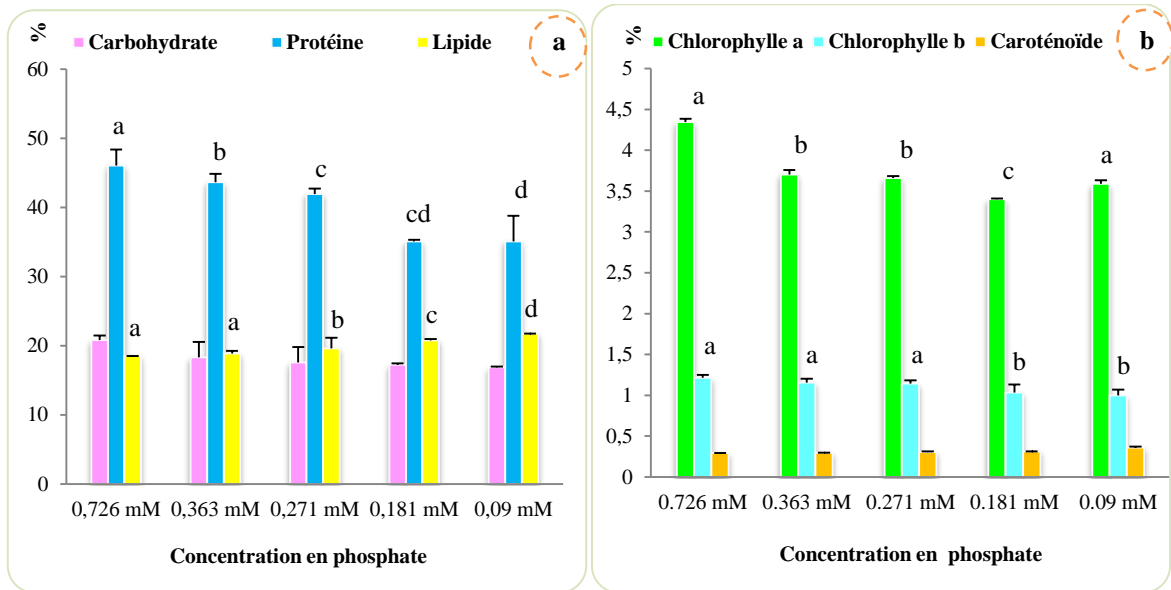


Figure 87 : Variation de la composition biochimique de la souche *Scenedesmus sp.* cultivée sous différentes concentrations en phosphate (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

III.3. Etude de la potentialité des effluents de piscicultures intensives à produire des microalgues en masse

- Paramètres physico-chimiques des effluents de pisciculture

Le tableau 41 récapitule les différentes valeurs moyennes des paramètres physico-chimiques enregistrés après analyse des effluents de pisciculture, nous observons une augmentation des différents paramètres au fil du temps, et de ce fait la demande chimique en oxygène (DCO) varie de 6,93 à 47,1 (mg/l), le pH de 8,07 à 9,12, la conductivité de 1110 à 1644 ($\mu\text{s}/\text{cm}$), les nitrites de 0,249 à 6,24 (mg/l), les nitrates de 5,53 à 140 (mg/l), les orthophosphate de 0,056 à 13,28 (mg/l), et enfin les phosphates qui augmentent de 0,184 à 4,34 (mg/l).

Tableau 41 : Qualité des effluents de pisciculture (paramètres physico-chimiques)

Jour du prélèvement	DCO (mg/l)	pH	Conductivité ($\mu\text{s}/\text{cm}$)	Nitrite (mg/l)	Nitrate (mg/l)	Orthophosphate (mg/l)	Phosphate (mg/l)
Effluent de pisciculture (J ₁)	6,93	8,07	1110	0,249	5,53	0,056	0,184
Effluent de pisciculture (J ₃)	12,02	8,28	1109	0,206	5,1	6,7	2,4
Effluent de pisciculture (J ₆)	24,8	8,62	1137	0,327	7,35	9,5	2,7
Effluent de pisciculture (J ₉)	53,9	8,96	1156	0,34	7,62	12,78	3,1
Effluent de pisciculture (J ₁₂)	47,1	9,12	1644	6,24	140	13,28	4,34

III.3.1. *Nannochloropsis gaditana*

• Taux de croissance

Le taux de croissance atteint est significativement ($p \leq 0,05$) supérieur pour les effluents de pisciculture issus du 6^{ème} ($0,66J^{-1} \pm 0008$) et 9^{ème} jours ($0,63J^{-1} \pm 0,0007$) comparé à l'effluent des 1^{er} et 3^{ème} jours et même celui du milieu conventionnel (F/2 Guillard) ($0,599J^{-1} \pm 0,005$), il apparait clairement que l'addition de vitamines stimule la croissance de la souche particulièrement lors de l'utilisation de l'effluent des 3^{ème} et 6^{ème} jours (figure 88).

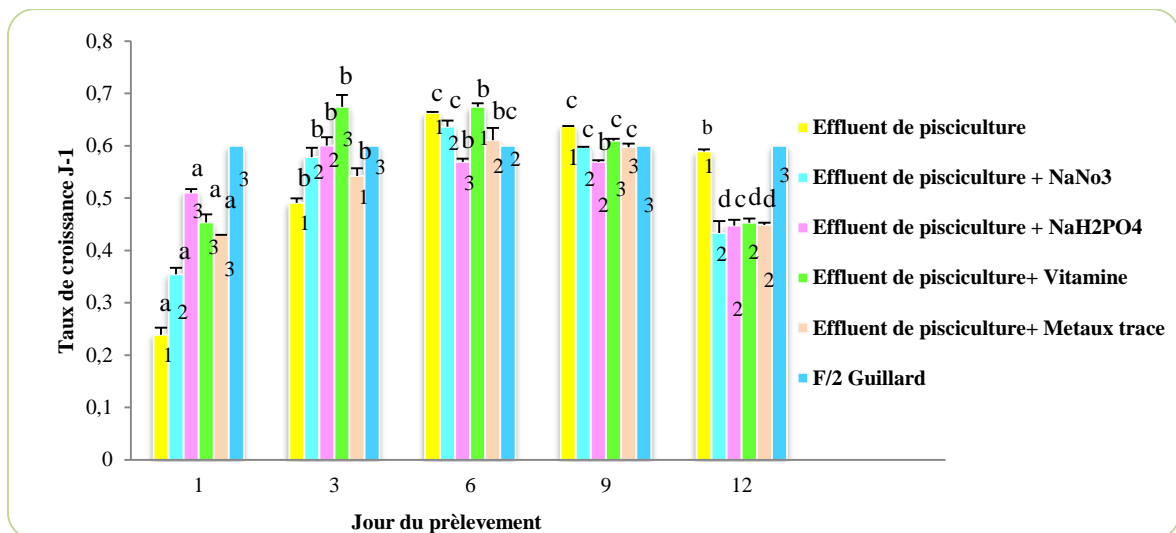


Figure 88 : Détermination du taux de croissance (μ) de la souche *Nannochloropsis gaditana* cultivée sous différents effluents de pisciculture ($n=3$), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

• Composition biochimique

Le meilleur pourcentage en protéines est enregistré sous l'effluent issu du 9^{ème} jour d'élevage additionné de $NaNO_3$ (figure 89) avec une valeur égale à ($46,68\% \pm 3,11$) ($p \leq 0,05$) en comparaison avec le milieu de culture F/2 Guillard qui ne permet à la cellule que d'accumuler ($39,36\% \pm 0,36$).

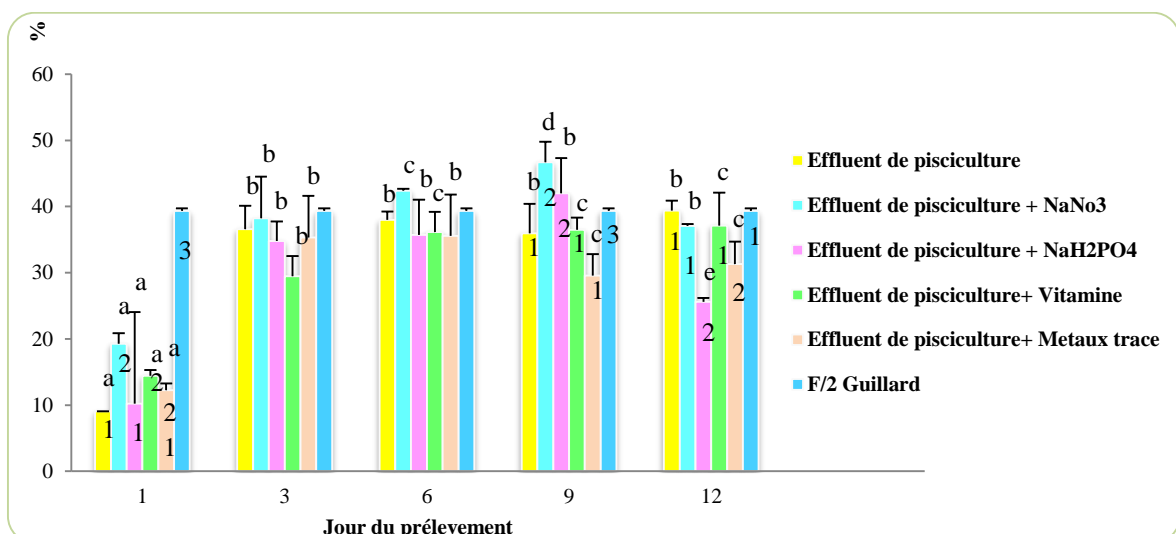


Figure 89 : Variation du pourcentage en protéines de la souche *Nannochloropsis gaditana* cultivée sous différents effluents de pisciculture ($n=3$), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

Les effluents de pisciculture du 6^{ème}, 9^{ème} et 12^{ème} jour permettent d'enregistrer des valeurs en carbohydrates égales à (16% ± 0,25), (18,13% ± 1,04) et (17,39% ± 0,07) respectivement, ce qui dépasse largement et significativement ($p \leq 0,05$) celles obtenues sous milieu F/2 Guillard (17,11% ± 0,35) (figure 90).

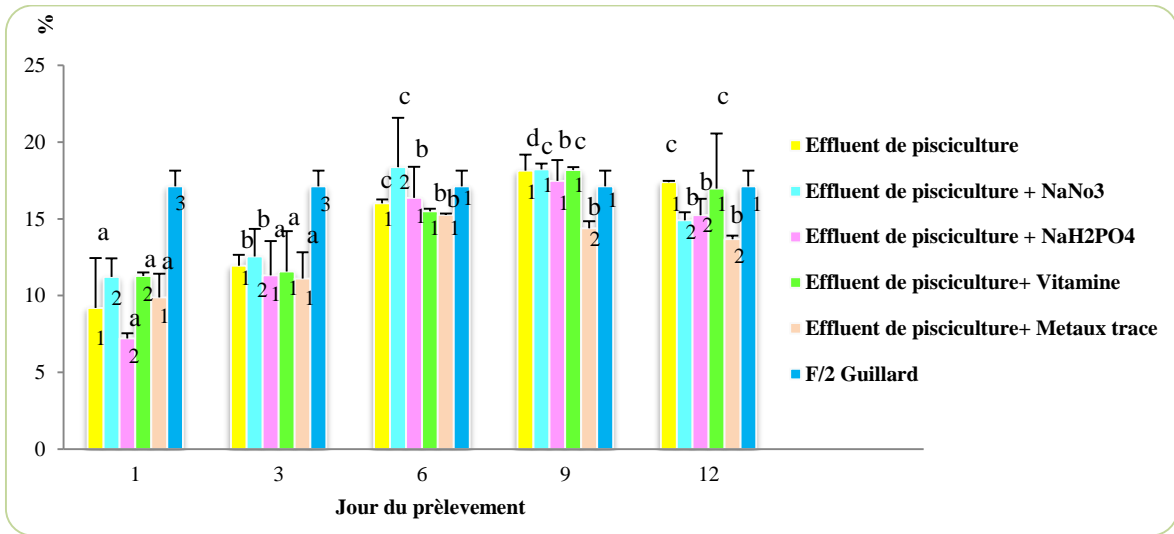


Figure 90 : Variation du pourcentage en carbohydrate de la souche *Nannochloropsis gaditana* cultivée sous différents effluents de pisciculture (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

L'analyse statistique de la variation du pourcentage en fonction de l'effluent utilisé (figure 91), montre une augmentation significative ($p \leq 0,05$) sous effluent issu du 6^{ème} prélèvement avec une valeur égale à 28,70% ± 0,62 l'enrichissement des effluents avec les constituants du milieu F2 Guillard n'exercent aucun effet significatif ($p \geq 0,05$) sur la composition lipidique de la micro algue marine *Nannochloropsis gaditana*.

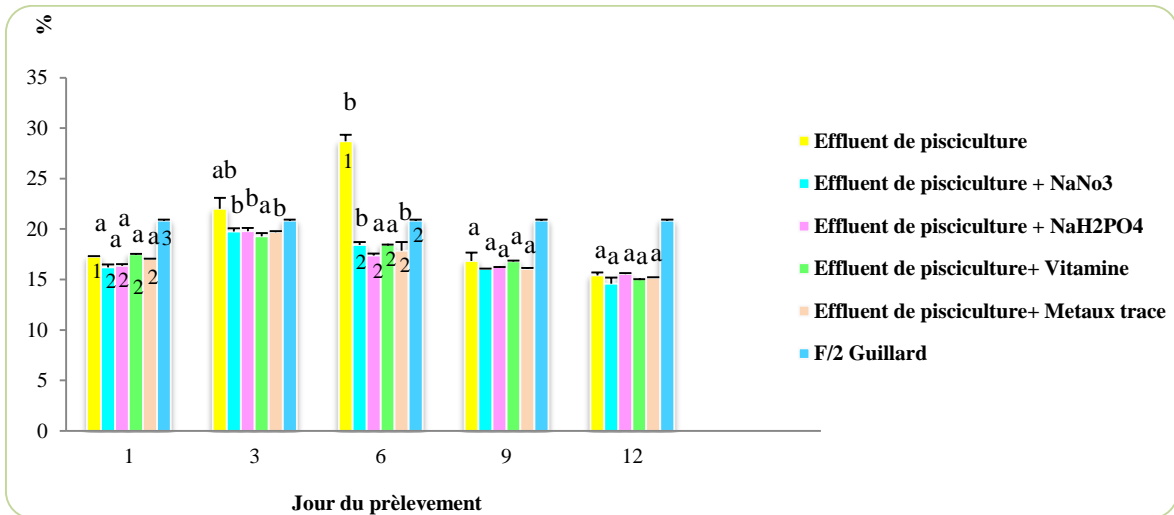


Figure 91 : Variation du pourcentage en lipides de la souche *Nannochloropsis gaditana* cultivée sous différents effluents de pisciculture (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

Les milieux effluents renferment une composition biochimique suffisante pour permettre à la cellule d'accumuler un pourcentage en chlorophylle a égale à (3,70% ± 0,31), (4,55% ± 0,03) et (4,30% ± 0,334) au 6^{ème}, 9^{ème} et 12^{ème} jour respectivement dépassant largement ($p \leq 0,05$) celui du milieu synthétique (figure 92), les pourcentages en caroténoïdes varient de

(0,203% \pm 0,0004) à (0,346% \pm 0,0005) sous effluent du 6^{ème} jour supplémenté de NaNO_3 (figure 92).

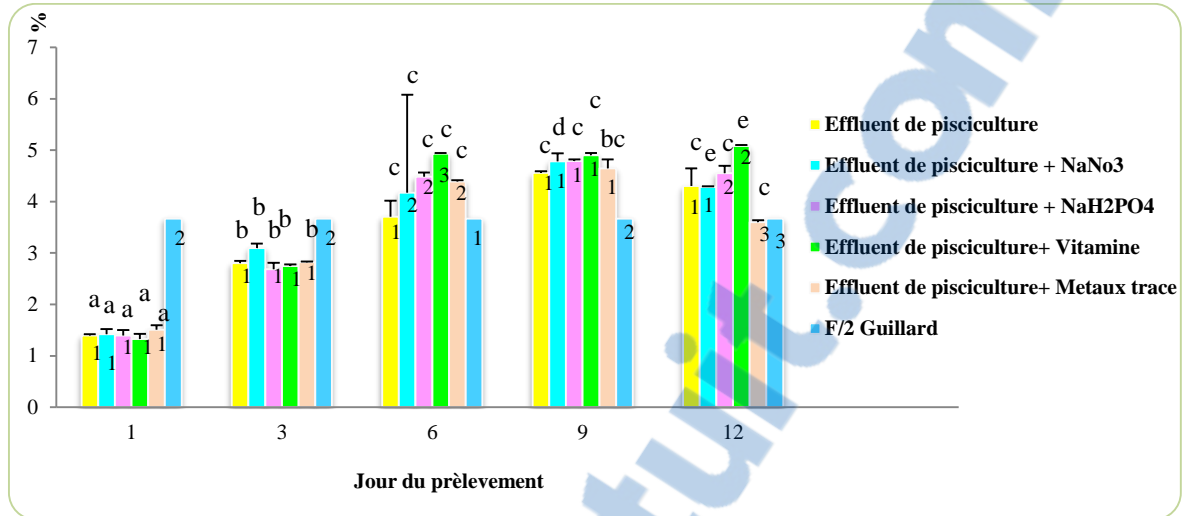


Figure 92 : Variation du pourcentage en chlorophylle a de la souche *Nannochloropsis gaditana* cultivée sous différents effluents de pisciculture (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

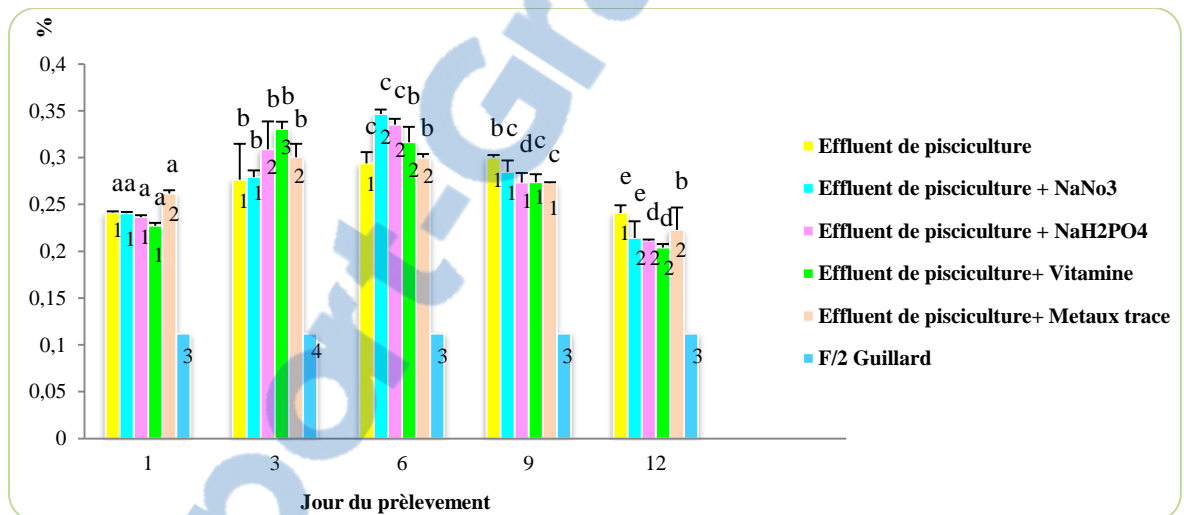


Figure 93 : Variation du pourcentage en caroténoïdes de la souche *Nannochloropsis gaditana* cultivée sous différents effluents de pisciculture (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

III.3.2. *Tetranephris brasiliensis*

• Taux de croissance

Dès le 6^{ème} jour l'effluent de pisciculture assure une croissance supérieure ($p \leq 0,05$) à celle atteinte sous le milieu conventionnel (F2/Guillard) avec un taux de croissance égale à $(0,662 \text{ J}^{-1} \pm 0,0018)$, l'ajout de vitamine permet d'augmenter cette dernière à un taux égale à $(0,674 \text{ J}^{-1} \pm 0,05)$ (figure 94), en parallèle l'effluent du 12^{ème} jour s'avère être très concentré en nutriments, la souche *Tetranephris brasiliensis* voit donc son taux de croissance diminuer à une valeur égale à $(0,531 \text{ J}^{-1} \pm 0,005)$.

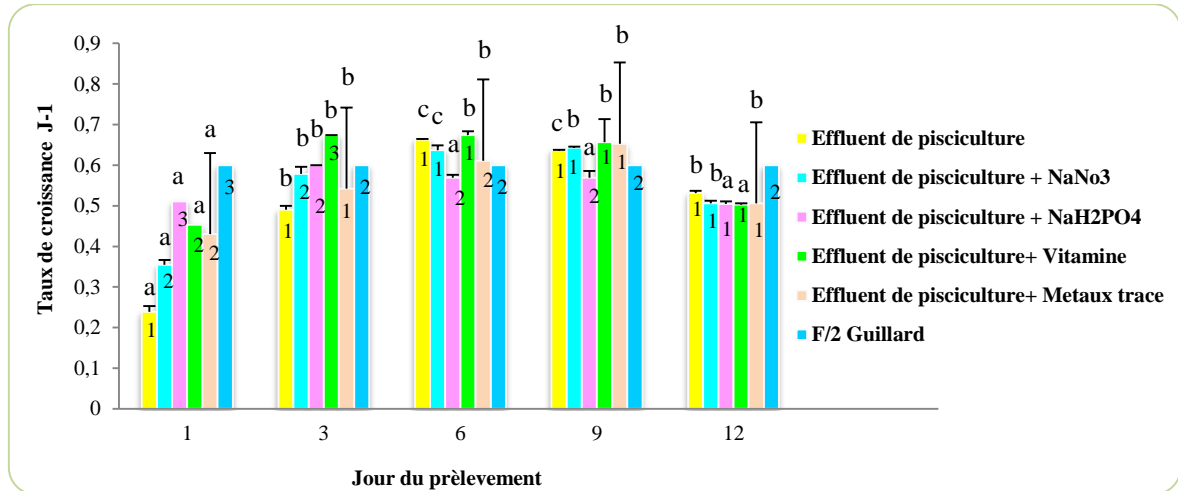


Figure 94 : Détermination du taux de croissance (μ) de la souche *T brasiliensis* cultivée sous différents effluents de pisciculture (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

• Composition biochimique

Le meilleur pourcentage en protéines ($46,38\% \pm 3,09$) ($p \leq 0,05$) est enregistré sous l'effluent issu du 9^{ème} jour enrichie en azote, suite aux résultats obtenues il apparaît que la supplémentation en source d'azote permet à la cellule de *Tetranephris brasiliensis* d'accumulée des pourcentages plus élevés en protéines jusqu'à un certain seuil (effluent du 12^{ème} jour) (figure 95).

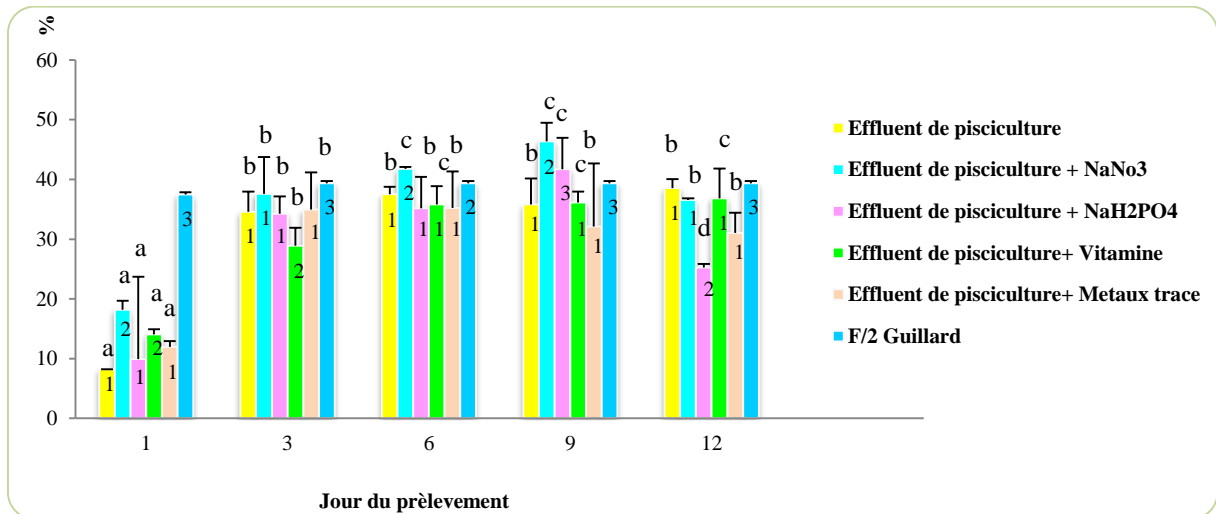


Figure 95 : Variation du pourcentage en protéines de la souche *T brasiliensis* cultivée sous différents effluents de pisciculture (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

L'étude statistique (ANOVA1) montre un effet significatif ($p \leq 0,05$) des différents effluents sur le pourcentage en carbohydrates. Les valeurs varient de ($8,34\% \pm 2,95$) à ($18,11\% \pm 0,35$) sous effluent du 9^{ème} jour enrichi en azote par du $NaNO_3$, de même pour les vitamines qui stimulent significativement ($p \leq 0,05$) la production en carbohydrates (figure 96).

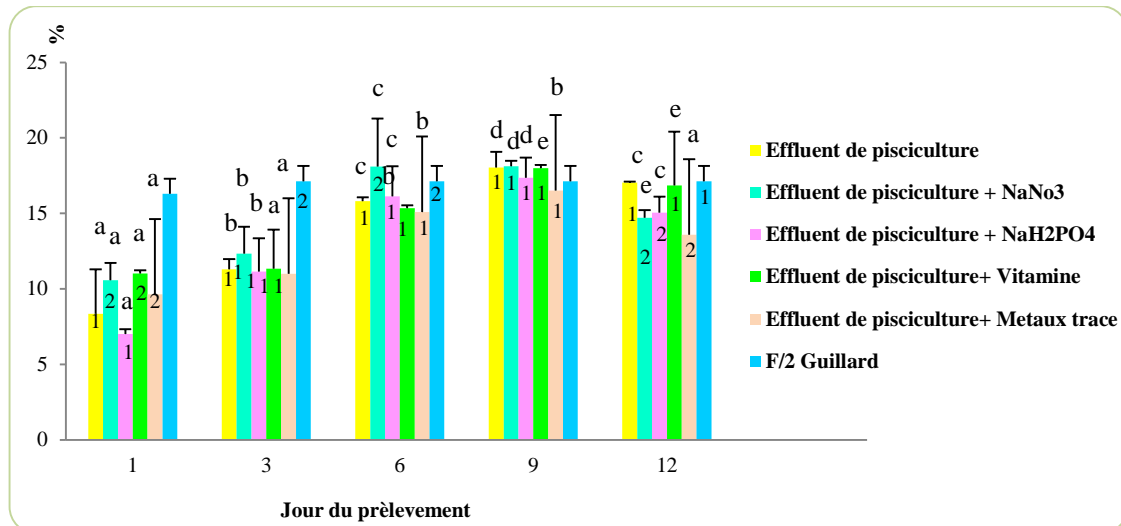


Figure 96 : Variation du pourcentage en carbohydrates de la souche *T brasiliensis* cultivée sous différents effluents de pisciculture (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

En ce qui concerne la composition biochimique de la souche en d'autres composés tels que les lipides totaux, les résultats de la figure 97 montre que, quelque soit l'effluent utilisé la souche *Tetranephris brasiliensis* a conservé une composition biochimique (pourcentage en lipides) quasi-constante à l'exception de l'effluent brute du 3^{ème} jour qui permet à la culture d'accumuler $19,09\% \pm 0,33$.

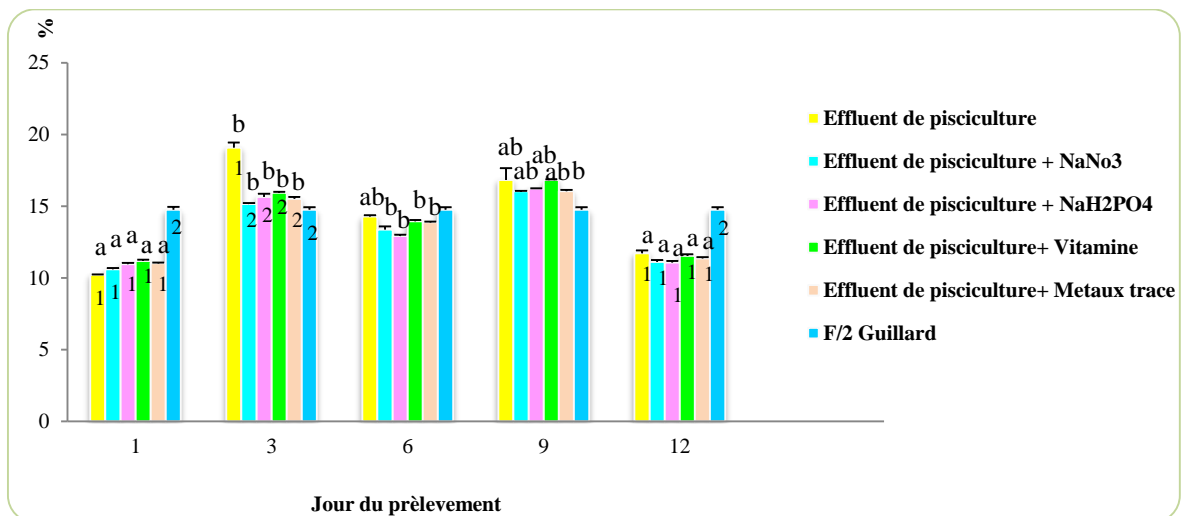


Figure 97 : Variation du pourcentage en lipides de la souche *T brasiliensis* cultivée sous différents effluents de pisciculture (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

Le contenu cellulaire en pigments varie d'une manière significative ($p \leq 0,05$) en utilisant différents effluents, de ce fait le meilleur pourcentage en chlorophylle a est enregistré sous effluent du 12^{ème} jour ($5,04\% \pm 0,02$), qui représente une eau très riche en azote et en phosphate encore plus après l'ajout de vitamines (figure 98a), celui de la chlorophylle b est noté sous effluent brute du 12^{ème} jour avec un pourcentage égale à ($2,33\% \pm 0,20$) (figure 98b).

Contrairement aux pigments chlorophylliens le pourcentage en caroténoïdes est significativement ($p \leq 0,05$) supérieure sous un milieu carencé, le maximum est donc atteint sous effluent brute du 3^{ème} jour ($0,56\% \pm 0,0005$).

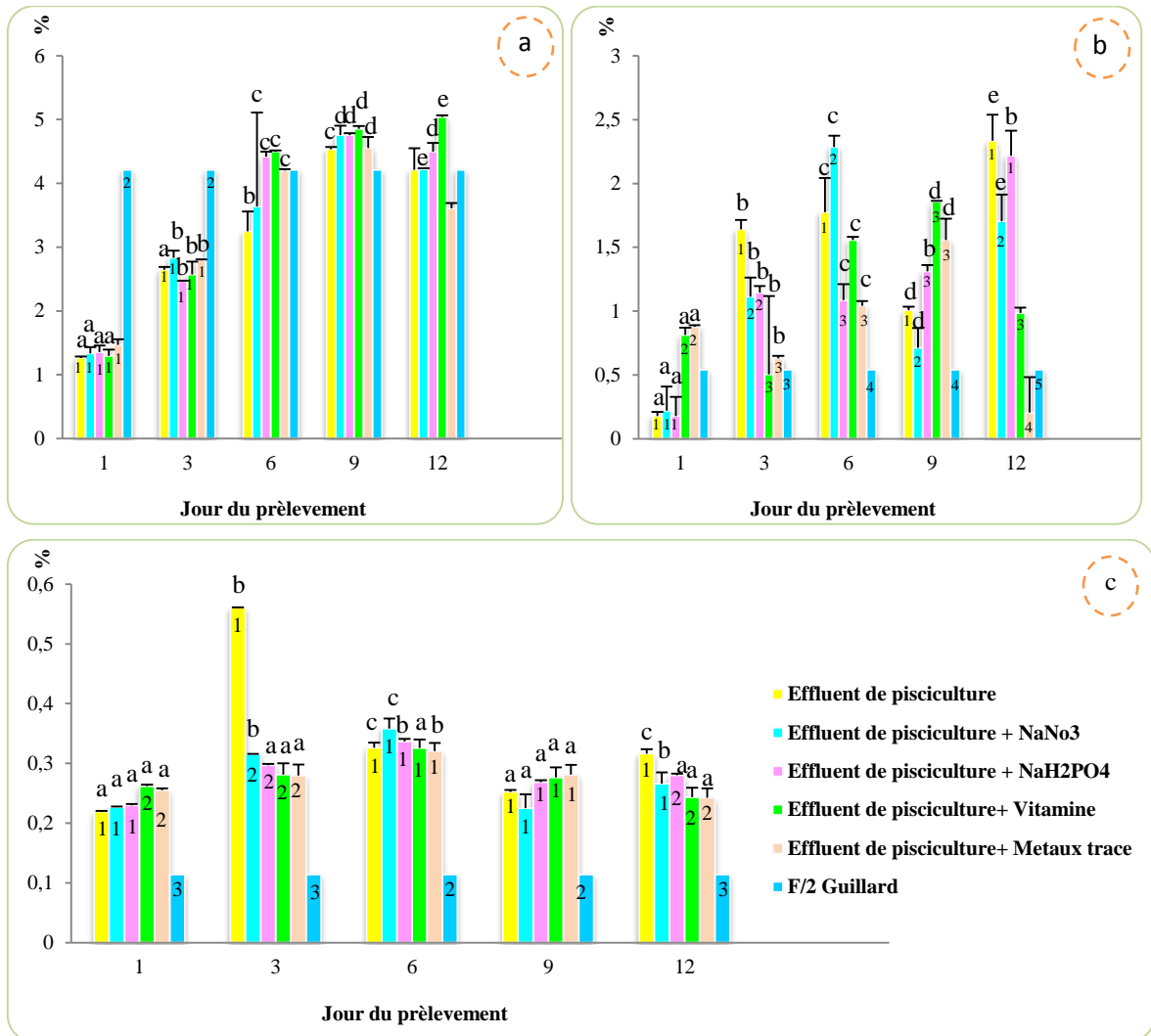


Figure 98 : Variation du pourcentage en chlorophylle a (a), chlorophylle b (b) et en caroténoïdes (c) de la souche *Tetranephris brasiliensis* cultivée sous différents effluents de pisciculture (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

III.3.3. *Scenedesmus sp.*

• Taux de croissance

La souche *Scenedesmus sp.* cultivée sous différents effluents montre une préférence significative ($p \leq 0,05$) pour l'effluent du 6^{ème} jour additionné de $NaNO_3$ avec un taux de croissance égale à $(0,563\% \pm 0,004)$, en revanche les effluents du 9^{ème} et 12^{ème} jour s'avère être trop riche et joue un effet inhibiteur sur la croissance cellulaire (figure 99).

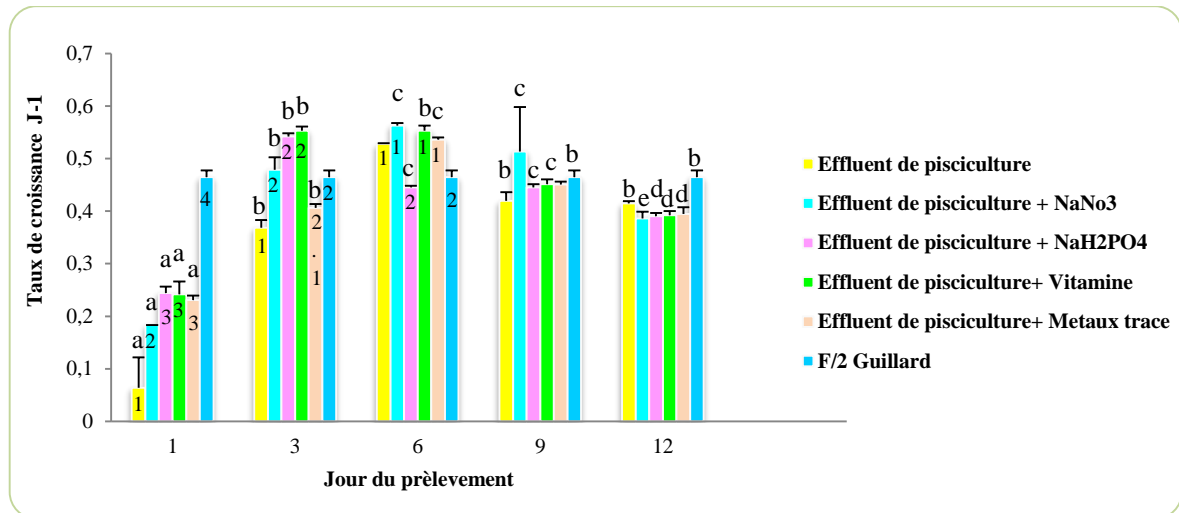


Figure 99 : Détermination du taux de croissance (μ) de la souche *Scenedesmus sp.* cultivée sous différents effluents de pisciculture (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

• Composition biochimique

Un milieu pauvre en nutriment (effluent du 1^{er} prélèvement) permet d'obtenir des pourcentages très faibles en protéines même après enrichissement.

Les pourcentages en protéines varient de ($9,16\% \pm 2,52$) à ($49,57\% \pm 1,78$) avec un taux maximal atteint sous effluent du 12^{ème} jour après suppléments en $NaNO_3$ (figure 100). L'ajout de la source azotée et phosphatée et celles de vitamines stimule également et d'une manière significative ($p \leq 0,05$) la production en protéines.

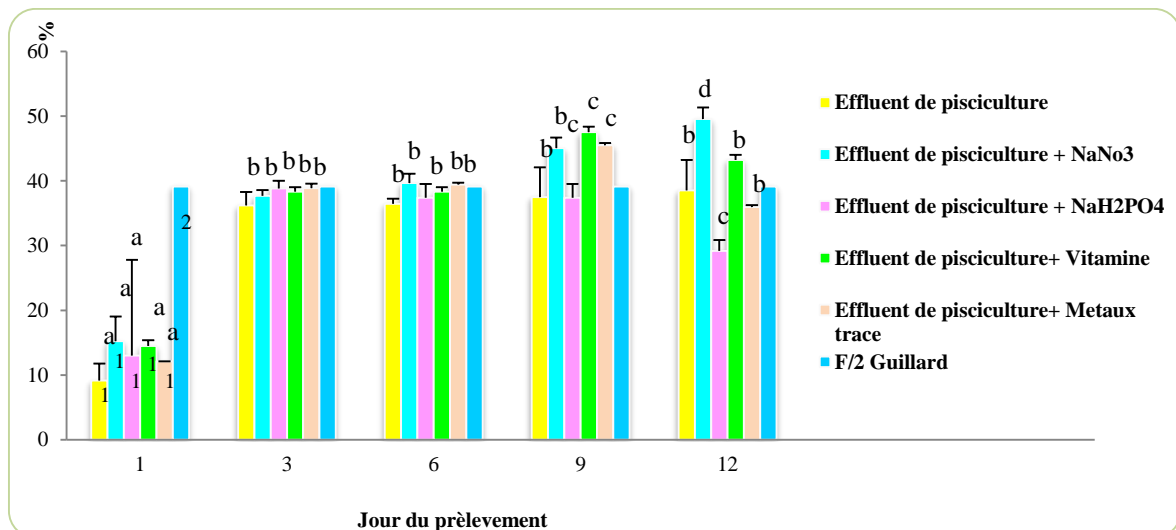


Figure 100 : Variation du pourcentage en protéines de la souche *Scenedesmus sp.* cultivée sous différents effluents de pisciculture (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

On note une variation significative ($p \leq 0,05$) du pourcentage en carbohydrates en fonction de l'effluent utilisé, le meilleur pourcentage est atteint sous effluent du 9^{ème} jour avec une valeur égale à ($24,93\% \pm 4,97$), néanmoins l'effluent de pisciculture issu du 6^{ème} jour ($20,14\% \pm 0,56$) assure déjà un pourcentage supérieur à celui obtenu sous milieu synthétique F/2 Guillard ($19,63\% \pm 0,059$) (figure 101).

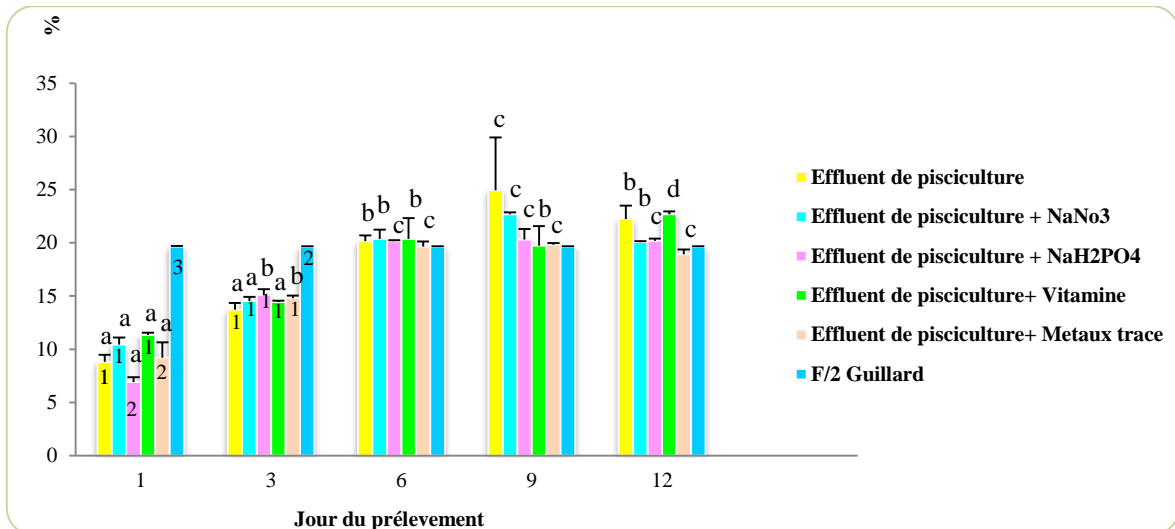


Figure 101 : Variation du pourcentage en carbohydrates de la souche *Scenedesmus sp.* cultivée sous différents effluents de pisciculture (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

L'étude statistique ANOVA 1 révèle l'effet significatif ($p \leq 0,05$) des différents effluents avant et après supplementations.

Le contenu en lipides totaux a été déterminé après 7 jours de culture (régime stationnaire) pour chaque prélèvement d'effluent. Les résultats sont présentés dans la figure 102, les cellules obtenues sont plus riches en lipides après culture sur effluent brute du 3eme jour avec un pourcentage égale à $20,6\% \pm 0,49$.

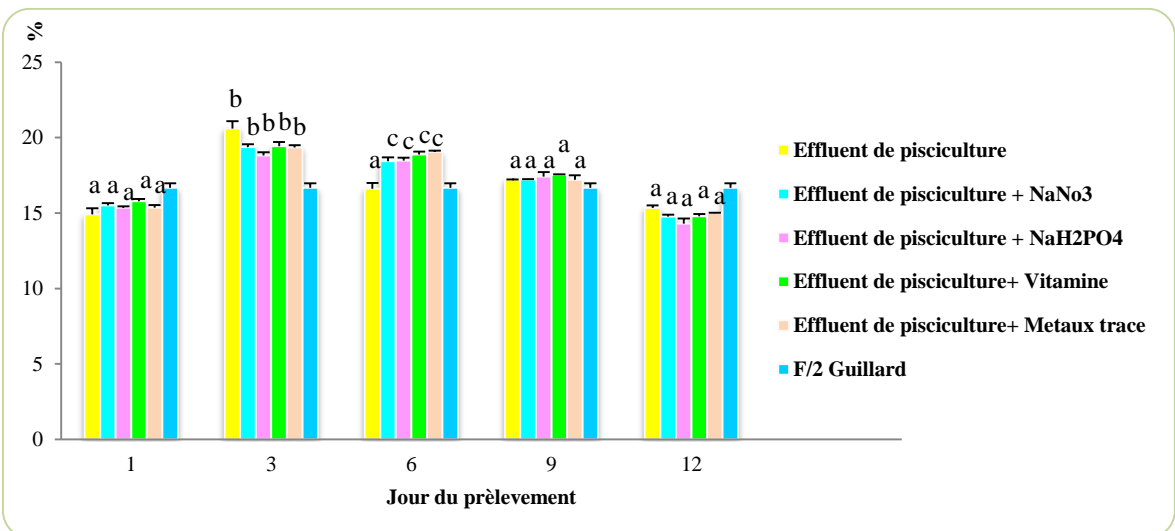


Figure 102 : Variation du pourcentage en lipides de la souche *Scenedesmus sp.* cultivée sous différents effluents de pisciculture (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

Les différents pigments de la souche *Scenedesmus sp.* ont été dosés en fin de la phase exponentielle, les résultats obtenus révèlent que le pourcentage en chlorophylle a ($4,78\% \pm 0,02$), chlorophylle b ($3,26\% \pm 0,04$) et celui des caroténoïdes ($0,226\% \pm 0,15$) est plus important sous effluent du 6^{ème} jour après ajout de vitamines, en utilisant l'effluent brute du 9^{ème} jour et celui du 6^{ème} jour respectivement (figure 103).

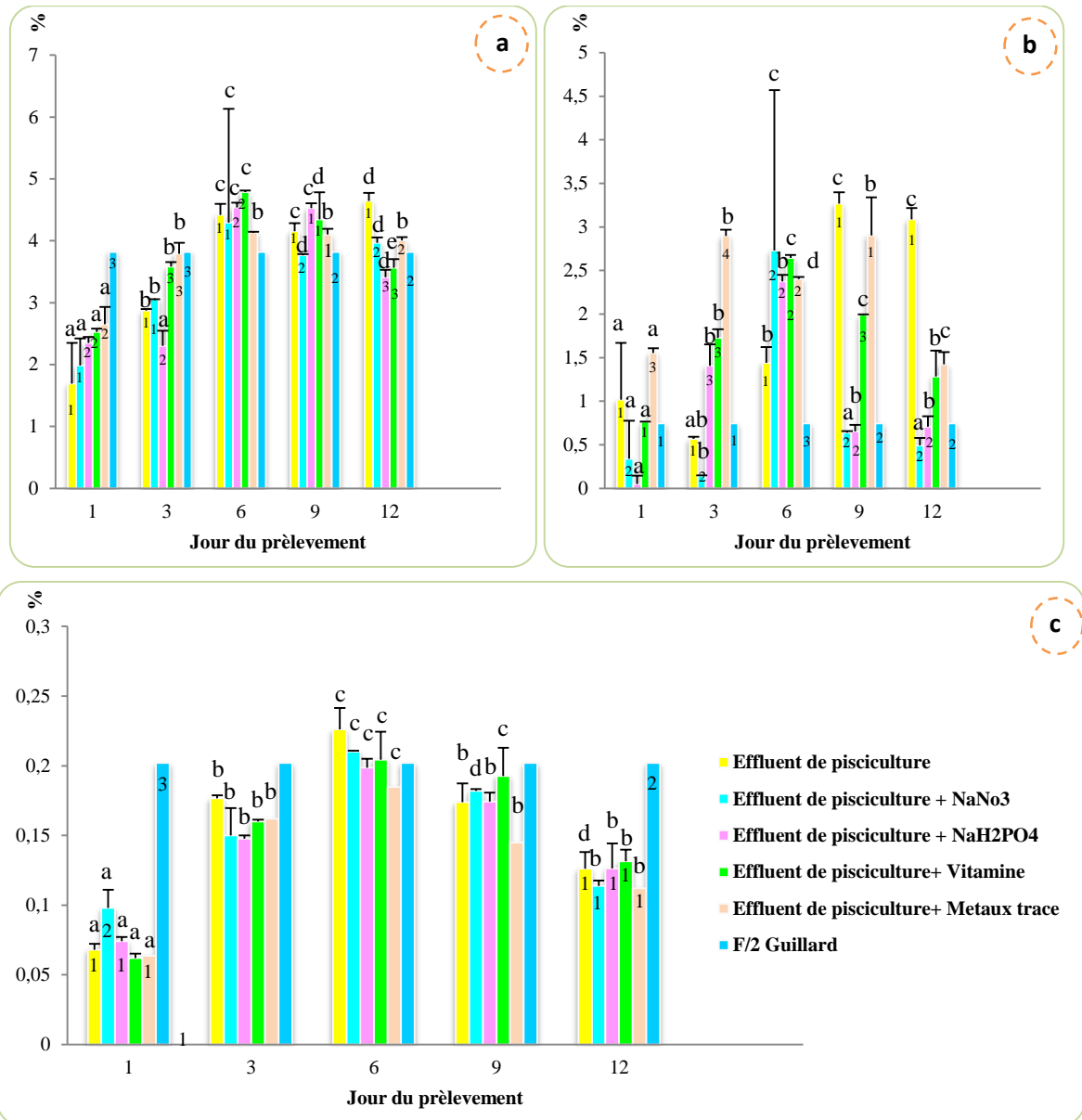


Figure 103 : Variation du pourcentage en chlorophylle a (a), chlorophylle b (b) et en caroténoïdes (c) de la souche *Scenedesmus sp.* cultivée sous différents effluents de pisciculture (n=3), les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p \leq 0,05$)

Chapitre IV - Discussion et conclusions

IV.1. Discussion

Lorsque l'on parle de microalgues ou de macroalgues, il s'agit tout d'abord de rappeler que ces deux termes sont associés à la notion plus générale du terme « algues ». Les algues ne constituent pas un groupe évolutif unique mais désignent une série d'organismes pouvant appartenir à des groupes phylogénétiques très différents et constituent un vaste assemblage artificiel d'organismes phylogénétiquement éloignés, dont l'étude a donné naissance à une discipline : la phycologie (Julie et *al.*, 2010).

Aujourd'hui 127000 noms d'espèces d'algues sont recensés dont la majorité sont des microalgues. Il reste encore de nombreuses espèces à découvrir et leur nombre total est estimé entre 100000 et plusieurs millions (Person et *al.*, 2011), l'étude (screening) de l'estuaire d'Oued Cheliff nous a permis d'observer, recenser et d'isoler une grande diversité de microalgues appartenant à différentes classes (diatomées, rhodophycées, chlorophycées, euglenophycées, eustigmatophyceae) et de différentes tailles variant de 2 µm à 25 µm, avec une dominance claire des chlorophycées et diatomées. Au niveau des estuaires, les facteurs environnementaux sont extrêmement variables surtout au niveau des paramètres hydrologiques et physico-chimiques (salinité, concentrations en nutriments, stratification, turbidité, apports d'eaux douces et d'eaux salées, température etc...). Or, le compartiment phytoplanctonique étant très sensible à ces paramètres et à leurs variations, il en résulte donc une grande variabilité de la composition taxonomique et de la dynamique phytoplanctonique (Caffier and Artigas, 2010).

Pour le microphytoplancton (microalgues), le schéma classique est décrit dès 1958 par Margalef, qui considère trois étapes successives : le premier stade est caractérisé par une croissance élevée des petites Diatomées, puis des Diatomées de plus grande taille et à faible taux de croissance deviennent dominantes, le troisième stade est caractérisé par la présence de Dinoflagellés. De nombreuses études ont permis de confirmer ce schéma de succession des assemblages phytoplanctoniques (Peterson et *al.*, 1999).

Généralement dans les estuaires, il y a deux zones de production phytoplanctonique. La première, en amont, est située dans la région fluviale (salinité inférieure à 5) où ce sont les espèces d'eau douce qui dominent. La seconde, en aval, est caractérisée par des salinités supérieures à 15, on y retrouve donc des espèces typiquement marines, entre les deux, la zone de transition oligo-mesohaline est plus ou moins caractérisée par un minimum en diversité en abondance et en biomasse (en accord avec la courbe de Remane) malgré le fait qu'il existe des espèces possédant une large tolérance aux variations de salinité (Mc Lusky, 1989). En général cette partie coïncide avec la zone de turbidité maximale (ZTM). Cette ZTM est caractérisée par une faible pénétration de la lumière.

Les taxons dominants sont *Cylindrotecha Sp*, *Dunaliella Sp* et les taxons ultraplanctoniques, ces derniers comportent divers groupes de microalgues vertes (diamètre < 3 µm) comme *Nannochloropsis oculata*, *Tetranephris brasiliensis*, *Chlorella vulgaris* ...

Deux communautés dominent les eaux douces de la partie la plus en amont de l'estuaire sous influence de la marée dynamique : les Diatomées et les Chlorophytes (largement représentées par le genre *Scenedesmus*).

Cependant seules trois espèces de microalgues sont retenues en tant que micro-organismes modèles. En effet, malgré le nombre important de travaux consacrés à la biologie et à la biotechnologie des microalgues, les aspects écophysiologiques de certaines d'entre elles, notamment *Scenedesmus sp*, *Tetranephris brasiliensis* et *Nannochloropsis gaditana* restent très fragmentaires. Ces espèces ont été identifiées par deux méthodes

se basant sur l'aspect morphologique en utilisant le microscope électronique à balayage (MEB), microscopes permettant par leur technologie de réaliser une identification très précise du phytoplancton (Guiselin *et al.*, 2009 ; Sazhin *et al.*, 2007), ainsi que par étude moléculaire.

L'étude qui a été réalisée représente en conséquence une source de données nouvelles permettant d'apprécier l'effet de différents paramètres physico-chimiques sur la production en masse ainsi que la composition biochimique d'une souche de microalgue marine et deux souches d'eau douce appartenant à la famille des *scenedesmaceae*.

Effectivement, les microalgues ont colonisé aussi bien les milieux marins, que les eaux douces ou bien encore les milieux terrestres, ce qui en fait des organismes adaptés à un grand nombre de conditions environnementales. Cette large diversité laisse entrevoir de nombreuses possibilités quant à leur utilisation.

La croissance d'une population, en termes d'augmentation de biomasse ou de nombre d'individus, résulte d'un grand nombre de processus cellulaires qui rendent son étude transdisciplinaire. Au niveau physiologique, les biologistes mesurent l'impact des conditions de croissance sur l'absorption de nutriments et sur leur conversion en matière organique. Les courbes de croissance de la souche marine et des souches d'eau douce ont été établies en premier lieu sous des conditions de culture favorables : toutes les souches ont présenté une bonne croissance dans les miniphotobioréacteurs avec une phase de latence relativement courte (2 jours au maximum) preuve de leur facilité d'adaptation aux conditions de culture, en fin de la période expérimentale nous remarquons un changement de couleur (du vert clair au vert foncé) pour *Scenedesmus sp.* et *Nannochloropsis gaditana* et du vert au marron pour *Tetranephris brasiliensis* signe d'une croissance considérable.

Les méthodes microscopiques, sont encore le seul moyen susceptible d'apporter des informations détaillées sur l'identité taxonomique des microalgues tout en estimant leur abondance. Les résultats des dénombrements sont exprimés en densité de populations par unité de volume. Néanmoins, Il est préférable d'étendre les avantages de l'observation microscopique des microalgues à la mesure de leurs dimensions cellulaires. De ce fait nous avons calculé le biovolume cellulaire V (équivalent à la vraie biomasse) et simultanément, la surface cellulaire S.

Ce biovolume présente une excellente équivalence avec la véritable biomasse puisque la masse volumique du phytoplancton est peu variable et très proche de celle de l'eau.

L'évolution de la surface cellulaire est de toute façon nécessaire car l'étendue de cette frontière avec le milieu extérieur joue un rôle essentiel dans l'assimilation photosynthétique et le métabolisme : échanges gazeux, absorption de nutriments, photosynthèse ou excrétion/exsudation.

L'environnement physico-chimique dans lequel se trouve la microalgue influence fortement sa croissance et son métabolisme et donc impacte directement les rendements de production de biomasse et/ou de production de biomolécules. Dans la littérature, le pH, la température et l'irradiance sont les principaux paramètres décrits (Villay, 2013).

Le premier paramètre étudié permet d'apprécier l'interdépendance entre la lumière et l'effet de la photopériode sur le taux de croissance ainsi que la variation de la composition biochimique. La lumière qui constitue la source d'énergie primaire et indispensable en conditions photoautotrophes est bien évidemment un facteur déterminant de la productivité du système, par conséquent aussi un facteur qui influe sur le taux de croissance des espèces microalgales.

Les résultats obtenus révèlent que les courbes de la croissance cellulaire de *Scenedesmus sp.*, *Tetranephris brasiliensis* et *Nannochloropsis gaditana* sous les différentes photopériodes et intensités lumineuses ne sont pas similaires, l'optimum (meilleur taux de croissance) est atteint sous une lumière continue pour les deux souches *Scenedesmus sp.*, *T brasiliensis* (souches appartenant à la même famille), des résultats qui sont en accord avec ceux obtenues par Anjala et al en 2015 pour la microalgue chlorophycée *Chlorella vulgaris*, qui montre une croissance supérieure sous 24h d'illumination à 5000 Lux, de même pour les espèces *Scenedesmus obliquus*, *Botryococcus braunii* étudiées par Krzeminska et al en 2014.

En effet, un apport plus important en lumière va stimuler la photosynthèse et donc stimuler la croissance de la biomasse microalgale. Cheirsilp et son équipe remarquent, que l'application d'une intensité lumineuse situé entre 80 et 135 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ augmente la croissance de leurs souches de microalgues (Cadoret1 and Bernard, 2008).

En revanche *N gaditana* présente une meilleure croissance sous 18h d'éclairage à 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Ces résultats sont soutenus par ceux de Wahidine et al en 2013 chez *Nannochloropsis sp.*. Il est important de ne pas soumettre les microalgues à une intensité lumineuse trop élevée sous peine de créer le phénomène de photo inhibition et donc le ralentissement de la photosynthèse (Cadoret1 and Bernard, 2008).

Les trois souches étudiées ont présenté une phase de latence prolongée sous une période d'éclairage de 12h et 06h. En effet, lorsque la lumière est insuffisante la croissance cellulaire est sous condition de photo limitation. Dans cet état une augmentation de l'intensité lumineuse améliore la croissance (Xue et al., 2011), et ceci reste vrai jusqu'à un certain seuil d'irradiance, au-delà de ce seuil, qualifié d'irradiance de saturation, les cellules restent viables mais ne se multiplient plus (Ritz et al., 2000). Cette valeur seuil est spécifique à chaque espèce de microalgue en fonction de la niche écologique qu'elle occupe, par conséquent, une production de microalgues peut se décrire au travers de l'irradiance optimale utilisée. Selon Meseck et al., (2005), il existe aussi une relation entre la durée d'éclairage et l'intensité lumineuse, les microalgues doivent être exposées à un nombre minimum de photons par jours pour se développer de façon optimale ce qui explique les résultats obtenus sous 12h et 6h d'illumination (plus faible est la quantité d'éclairage plus longue doit être la durée de la phase lumineuse).

En termes d'exigence à la lumière, on remarque que nos souches exigent une intensité lumineuse moyenne. C'est le cas aussi pour la microalgue *Spirulina platensis* qui se développe parfaitement à des intensités lumineuses inférieures à 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, en comparaison avec d'autres espèces d'algues telles que : *Haslea ostrearia*, *Porphyridium cruentum* et *Dunaliella tertiolecta*, qui requièrent une intensité de 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Rech, 2004), ou *Chlorella vulgaris* qui requiert une intensité de 180 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Clément-Larosière et al., 2012).

Les microalgues sont bien évidemment cultivées pour des éléments particuliers de leur composition (molécules à haute valeur ajoutée). De ce fait une étude parallèle est menée sur la teneur de plusieurs composés biochimiques à savoir les carbohydrates, les protéines et les lipides ainsi que la teneur en pigments (chlorophylle a, chlorophylle b et les caroténoïdes) provenant d'une matière sèche recueillie en fin de la phase exponentielle (début de la phase stationnaire).

Nous enregistrons les meilleurs pourcentages en carbohydrates sous illumination continue à 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ chez *N gaditana* (17,16% \pm 1,14), *T brasiliensis* (17,90% \pm 1,23) et chez *Scenedesmus sp.* (19,25% \pm 1,99), des résultats qui concordent parfaitement avec ceux notés par Fabregas et al., (2004) sur *Nannochloropsis sp* qui

accumule le meilleur pourcentage en carbohydrates en augmentant l'intensité lumineuse : étant donné que les mécanismes mis en jeu sont différents en fonction de la phase dans laquelle se trouvent les microalgues, la production de carbohydrates (glucides) est plus importante en présence de lumière et servira donc comme molécule de stockage d'énergie en obscurité (respiration). Le faible pourcentage noté sous des périodes d'éclairage plus courtes peut être donc causé par la perte de ce dernier pendant le cycle sombre (Fabregas et *al.*, 2002).

A ce jour, plusieurs méthodes d'expression de protéines ont été développées, offrant chacune des avantages et des inconvénients. Au cours de cette étude nous avons opté pour un dosage par la méthode de Bradford (1976). Les meilleurs résultats obtenus en protéines sont notés sous 18h d'éclairage à $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ chez *Scenedesmus sp.* ($46,30\% \pm 1,99$) et chez *N. gaditana* ($31,41\% \pm 3,48$), et sous 24h d'illumination chez *T. brasiliensis* ($40,37\% \pm 4,67$). Nous observons une diminution simultanée de la teneur protéique et celle de la croissance cellulaire : cette diminution est probablement due à une adaptation physiologique des cellules qui provoque une inhibition de la production de certaines protéines et induit la production et l'accumulation d'autres protéines, notamment celles qui sont responsables de protection sous condition de stress (Bouchoucha et *al.*, 2015).

Le cycle d'éclairage (photopériode) ainsi que l'intensité lumineuse utilisés ont aussi un impact sur l'activité photosynthétique et donc sur le métabolisme des microalgues, plus la phase d'éclairage est longue (cycle éclairage/obscurité d'au minimum 18h/6h) plus les rendements en biomasse et l'accumulation de lipides sont importants (Reboloso Fuentes et *al.*, 2001). En effet, les meilleurs pourcentages en lipides sont obtenus sous éclairage continu à $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ à savoir ($24,07\% \pm 1,30$), ($16\% \pm 0,06$) et ($20,2\% \pm 0,19$) pour *N. gaditana*, *T. brasiliensis* ainsi que *Scenedesmus sp.* respectivement. D'après (Khotimchenko and Yakovleva, 2005) la lumière stimule la synthèse des acides gras, la croissance ainsi que les chloroplastes membranaires, et de plus pendant la période lumineuse les microalgues effectuent le phénomène de photo réduction qui va permettre l'absorption de l'énergie lumineuse et son stockage sous forme de molécules porteuses d'énergie telles que l'ATP et le NADPH par des réactions exergoniques. Ces pools d'énergie peuvent être utilisés par la suite pour la synthèse de biomolécules (Hrun et *al.*, 2014).

Babu en 2012 a aussi signalé que de faibles intensités lumineuses provoquent la baisse de la productivité lipidique due à la limitation de l'énergie exigée pour effectuer les réactions photosynthétiques.

Les pigments représentent aussi une des voies de valorisations intéressantes des microalgues. Un pigment est une substance absorbant la lumière visible et possédant la couleur des radiations qu'il n'absorbe pas (Jupin and Lamant, 1999), ainsi les chlorophylles apparaissent de couleur verte et les caroténoïdes de couleurs orange. Ces pigments peuvent servir dans le domaine alimentaire en tant que colorants ou encore dans le domaine pharmaceutique en tant que pigments fluorescents. Il existe des pigments accessoires qui améliorent l'utilisation de l'énergie lumineuse et qui leur confèrent une couleur différente selon la combinaison de pigments.

Les résultats montrent que la teneur en pigments diminue avec l'augmentation des intensités lumineuses. Ce phénomène de photoadaptation a déjà été observé par Takache et *al.* (2010) : en présence d'une intensité lumineuse plus élevée, la cellule reçoit plus de lumière, menant à une diminution du contenu pigmentaire. Ces observations s'accordent également avec les données de la littérature (Hu et *al.*, 2008 ; et Finazzi et *al.*, 2010). Dans leur étude, Finazzi et *al.*, (2010) ont rapporté qu'en faible éclairage, les microalgues augmentent le taux de chlorophylles dans leurs chloroplastes.

Un autre paramètre ayant une relation étroite avec la lumière est étudié à savoir la surface spécifique éclairée notée as qui caractérise chaque système de culture. Ce paramètre relie deux notions essentielles, la surface éclairée qui est liée donc à l'apport d'énergie lumineuse à la culture, et le volume de la culture dans lequel cette lumière s'atténue. Dans le cas des systèmes plats, la surface spécifique éclairée exprimée en m^{-1} (m^2/m^3) sera inversement proportionnelle à l'épaisseur de la culture (L). Au cours de cette expérience nous avons étudié l'effet d'une multitude de miniphotobioréacteurs cylindriques à différentes surfaces spécifiques éclairées (0,2 ; 0,153 ; 0,125 ; 0,1 m^{-1}). Il s'avère que les trois souches étudiées adoptent le même comportement, la croissance cellulaire augmente en augmentant la valeur de la surface spécifique éclairée. Le meilleur résultat est retenu par la suite pour la conception d'un système de culture plat, une autre manière d'améliorer la pénétration de la lumière dans un photobioréacteur, de diminuer le trajet parcouru par celle-ci, d'augmenter le rapport surface/volume (Cornet, 2010 ; Zijffers et al., 2010) et de permettre donc une comparaison plus poussée entre les deux géométries (cylindrique et plate). On constate une similitude dans la cinétique de croissance des souches cultivées dans les deux systèmes de culture avec une préférence significative ($p \leq 0,05$) pour le système plat. En effet, leur design cherche à optimiser la distribution de la lumière et à améliorer l'efficacité du mélange. Les PBRs de type plan, apparus dans les années 1950, sont caractérisés par une faible épaisseur, généralement inférieure à 10 cm (Chisti, 2007), ce qui permet d'améliorer l'exploitation de la lumière par la culture en limitant la zone d'ombrage (Degen et al., 2001).

La température, un autre facteur qui intervient dans le développement et la croissance cellulaire des microalgues permet de réguler leurs réponses physiologiques et morphologiques (Kumar et al., 2010) et provoque des changements de la structure cellulaire notamment de leur volume (Richmond, 2004). L'optimum thermique pour les trois souches se situe à 25°C avec des taux de croissances égaux à ($0,316 J^{-1} \pm 0,001$), ($0,344 J^{-1} \pm 0,005$) et ($0,317 J^{-1} \pm 0,004$) pour *N gaditana*, *T brasiliensis* et *Scenedesmus sp.* respectivement, selon Kumar et al. (2010). Les microalgues tolèrent en général une gamme de température comprise entre 15 et 26°C avec une concentration cellulaire optimale à 23°C.

La croissance des deux souches *N gaditana* et *T brasiliensis* est ralentie sous une température égale à 20°C. En effet, lorsque la cellule subit des températures basses, son métabolisme est tempéré, mais la quantité d'énergie absorbée par la photosynthèse reste identique. Elle absorbe donc trop d'énergie par rapport à sa capacité à l'utiliser et souffre donc de photoinhibition (Hune et al. 1998). *Scenedesmus sp.*, une microalgue mésophile, est en mesure de s'adapter à des variations de température plus importante avec un optimum sous 25°C ($0,317 J^{-1} \pm 0,004$). Selon Xin et al. (2011) les courbes de croissance de *Scenedesmus* sont parallèles lors de la phase de croissance puis elles se superposent en phase stationnaire pour des températures de 20 et 30°C. Au final, la biomasse produite est similaire pour les différentes conditions de température, cependant le taux de croissance est plus important à 25°C ($0,8 j^{-1}$) ce qui concorde parfaitement avec les résultats obtenus lors de cette étude.

Une variation importante de la température peut affecter les diverses réactions biochimiques interne. Ces effets peuvent affecter les vitesses et les capacités d'acquisition des nutriments, Demon et al. (1989) ont entre autres observé une augmentation de la capacité de retrait de l'arsenic, du cadmium, du zinc et du cuivre avec l'augmentation de la température chez *Scenedesmus* (Boileau, 2015). De la même façon, la température peut modifier la composition chimique intracellulaire en modifiant la nature des composés présents dans le milieu. L'augmentation de la température à 30°C diminue le taux de croissance ainsi que la biomasse maximale des trois souches étudiées car une hausse de celle-ci va diminuer l'affinité de la Rubisco pour le CO_2 en élevant son seuil de saturation pour celui-ci (Beardall et al., 2002).

Les variations de la composition protéique, glucidique et lipidique des trois souches cultivées sous 3 températures différentes sont étudiées, L'analyse des résultats obtenus montre que la synthèse protéique évolue à la baisse avec l'accroissement de la température de culture, le meilleur pourcentage en protéines est enregistré sous une température moins élevée que l'optimum (20°C) avec des valeurs égales à (31,93% ± 0,19), (41,46% ± 0,65) et (43,85% ± 1,61) pour *N gaditana*, *T brasiliensis* et *Scenedesmus sp.* respectivement. De même il a été rapporté par Juneja (2013) que Rhee and Gotham en 1981 ont observé une augmentation de la concentration en protéines chez *Scenedesmus sp.* sous une température plus basse que l'optimum. L'accroissement des teneurs en protéines, aux basses températures a également été signalée dans d'autres travaux sur la microalgue *Chlorella sp.* (Teoh et al., 2004). Ce phénomène serait étroitement lié à l'augmentation de l'incorporation du carbone dans les protéines, induite par la diminution de la température (Tahiri et al., 2000). D'après Chapman et al. (1983) ce type de réponse refléterait les besoins croissants en enzymes des cellules ou un effet de compensation de la réduction de la fluidité membranaire.

Contrairement aux composés protéiques, les teneurs en carbohydrates augmentent de manière considérable avec l'accroissement de la température de culture, en particulier entre 25 et 30°C avec des valeurs égales à (19,37% ± 0,49), (19,26% ± 0,03) et (43,85% ± 1,61) sous 30°C pour, *T brasiliensis* et *Scenedesmus sp.* respectivement et (17,92% ± 0,65) sous 25°C pour *N gaditana*. Des observations similaires ont été notées sur d'autres espèces (Belkoura et al., 1997), en effet la température va potentiellement influencer la production d'hydrates de carbone. Sayegh et Montagnes (2011) démontrent quant à eux une absence de relation entre la température et le contenu en carbohydrates chez *Isochrysis galbana*.

Par opposition aux deux premiers constituants cellulaires, l'influence de la température sur les teneurs en lipides des trois souches ne fait apparaître aucune tendance précise, les pourcentages les plus élevés étant observés à une température intermédiaire de 25°C chez *N gaditana* (17,92% ± 0,65) à (30°C) pour *Scenedesmus sp.* (21,27% ± 2,26) et à 20°C chez *T brasiliensis* (18,59% ± 0,23). Des comportements similaires ont été signalés chez d'autres espèces de microalgues (Tahiri, 2000), de même pour Hu (2004) sans qu'aucune explication physiologique ne soit avancée. En effet, une revue plus large des différents travaux réalisés sur les lipides chez les microalgues permet de se rendre compte de la complexité des mécanismes de régulation du métabolisme de ces composés.

Les caroténoïdes jouent un rôle essentiel dans le centre des réactions photosynthétique soit en participant au transfert d'énergie traité, soit en protégeant le centre réactionnel de l'auto oxydation. Selon Tripathi en 2002, l'accumulation des caroténoïdes chez les microalgues augmente en augmentant la température en raison de l'augmentation des effets oxydatifs, ce qui corrèle parfaitement avec nos résultats.

Dans le but d'étudier l'impact du potentiel hydrogène, des expériences ont été réalisées en variant ce dernier (pH 4, 6, 8, et 10), le taux de croissance le plus élevé est enregistré à pH 8 et ceux pour toutes les souches (0,245 ± 0,001) pour *N gaditana*, (0,317 ± 0,004) pour *Scenedesmus sp.* et (0,316 ± 0,0005) pour *T brasiliensis*. Ces résultats sont soutenus par ceux de Khatoon et al., (2014) où il a été signalé qu'un pH de 8,5 permettrait d'obtenir le meilleur rendement chez *Nannochloropsis sp.* Les deux souches *N gaditana* et *T brasiliensis* cultivées à pH (6) et pH (10) ont montré une densité cellulaire significativement ($p \leq 0,05$) inférieure à celle rapportée sous pH (8). Effectivement, un pH au delà de 9 influence aussi indirectement la croissance cellulaire en intervenant dans la solubilité de certains éléments nutritifs : les carbonates et les phosphates de *Ca*, *Mg* ou *Fe* qui ont tendance à précipiter quand le pH du milieu augmente (Sirisansaneeyakul et al., 2011), une forte baisse de la croissance voire une perte totale de la biomasse algale et notée à pH très acide (pH (4)). Ces

résultats sont appuyés par ceux de Khalil et *al.* (2010) qui démontrent que le rendement le plus élevé en matière sèche de *D. bardawil* a été obtenu à pH (7,5) ainsi qu'une forte baisse de la biomasse à pH (4). L'étude de Liu et *al.* (2007) a également affirmé que la croissance de *Chattonella marina* est restée inchangée sous un pH compris entre (7,5 et 8,5), mais diminue significativement lorsque le pH augmente au-delà de 9.

La concentration de dioxyde de carbone libre dans le milieu devient très importante à pH 5 et 6. Au-dessus de ces valeurs cette concentration commence à se transformer en bicarbonate, réduisant le CO_2 libre disponible et par conséquent contribue à la diminution de la croissance des microalgues (Hodaifa et *al.*, 2009).

En outre, la microalgue *Scenedesmus sp.* présente une croissance modérée à pH(4). Cette dernière est caractérisée par une tolérance à de larges gammes de pH (comprise entre 4 et 10) bien que celui optimal soit de l'ordre de 7,5 à 8,0 (Ho et *al.* 2010). En effet, lorsque le pH externe diminue, la quantité de H^+ extracellulaire augmente, les cellules qui vont résister à cette entrée de H^+ sont celles capables d'adapter leur production de molécules d'ATP, car le transport des H^+ en excès vers l'extérieur de la cellule est un processus énergivore (Gertoff-Elias et *al.*, 2005). Lorsque le pH extérieur est modifié, le gradient de pH entre la cellule et le milieu environnant change et un nouvel équilibre va tenter de se former ce qui va tendre vers la modification du pH intracellulaire. La capacité de la cellule à survivre à des variations de pH va être dépendante de ses facultés à modifier sa physiologie pour contrer le gradient de pH.

Peu de changement au niveau de la composition biochimique (carbohydrates, protéines et lipides) des microalgues étudiées ont été notés, ce qui correspond à l'une des conclusions établies par Vidyashankar et *al.* en 2013 qui confirme que le pH n'a pas d'influence notable sur la composition et la production de métabolites tels que les lipides. En combinant tous les résultats, on a constaté que *N gaditana*. était l'espèce accumulant le plus haut pourcentage en lipides.

Du fait de leurs capacités à s'adapter à une large gamme d'environnements, les microalgues sont en mesure de supporter des milieux aux propriétés physico-chimiques extrêmement variées. Ainsi certaines microalgues sont adaptées à l'eau douce (*Chlorella*, *Synura*, *Oscillatoria*...), d'autres aux milieux marins (*Rhodella*, *Porphyridium*...) et certaines sont halophiles (*Gyrodinium*, *Dunaliella*...) (Eggert et *al.*, 2007). Une des souches faisant l'objet de cette étude est une microalgue marine (*Nannochloropsis gaditana*), d'où l'intérêt de tester l'effet de différentes concentrations en $NaCl$ (de 0 à 75 PSU) sur sa croissance ainsi que sa composition biochimique.

Une salinité de 30 PSU permet à la souche marine *N gaditana* d'atteindre le meilleur taux de croissance ($0,341 \pm 0,002 j^{-1}$) et une biomasse maximale de 459×10^5 cellules.ml⁻¹ au bout du 12^{ème} jour de culture. Les microalgues marines peuvent s'adapter à des milieux dont la concentration en $NaCl$ varient de 10% à 50% (m/v). Au-delà de ces valeurs seuil, la croissance cellulaire est ralentie voire stoppée (Eggert et *al.* 2007), selon leur degré d'adaptation on peut les regrouper en microalgue halophile et halotolérantes (Rao et *al.*, 2007).

Notre souche montre une densité cellulaire significativement ($p \leq 0,05$) plus faible lorsqu'elle est cultivée à une salinité de 40, 60 et 75 PSU. A forte salinité, la croissance de *N gaditana* a été suspendue en raison de l'accumulation des solutés qui agissent comme un osmoprotectant stabilisant les enzymes métaboliques (Fatma et *al.* 2007). Bartley et *al.* (2013) démontrent de même, qu'une augmentation de la salinité entraînerait une diminution de la croissance chez *Nannochloropsis sp.* cultivée à 40 PSU, suite à une inhibition de l'activité photosynthétique (Lu et *al.*, 1999). Effectivement, chaque microalgue possède une

salinité favorisant sa croissance correspondant souvent à la salinité de son habitat naturel. Par conséquent, un changement de salinité peut avoir un effet sur la productivité de la microalgue. Le stress osmotique, lié à une salinité du milieu de culture non optimale, peut avoir un impact sur l'appareil photosynthétique et de ce fait sur la croissance microalgale (Artu., 2016).

Exposer les microalgues à des niveaux de salinité plus bas ou plus élevés que leurs niveaux naturels peut changer et modifier leur composition, lorsque la concentration en sel devient trop importante pour la microalgue marine, il se crée un stress osmotique qui induit des changements métaboliques. Toute fluctuation de la salinité entraînerait la production d'une biomasse microalgale à faible teneur en protéines (de 29,60% ± 0,50 sous 30 PSU à 24,91% ± 0,22 sous 70 PSU). Ces résultats sont conformes aux résultats trouvés par Gu *et al.* (2012). Selon Allakhverdiev *et al.*, (2005), une concentration élevée en NaCl provoquerait l'inactivation de l'ATP-synthase ce qui entraîne par la suite une inhibition de la synthèse protéique. De même, une étude sur la microalgue *Tetraselmis suecica* démontre une réduction de 20% de la teneur en protéines suite à une augmentation de la salinité, des résultats qui sont en concordance avec ceux trouvés lors de cette étude. La microalgue *Dunaliella viridis* augmente aussi l'expression d'un gène codant pour la sous unité 26S du protéasome (responsable de la dégradation des protéines) en réponse à l'augmentation de la salinité externe. Ce phénomène indique, selon Sun *et al.* (2010) que la tolérance à la salinité de *D. viridis* dépend de la capacité de la microalgue à dégrader ses protéines endommagées.

En outre, cette augmentation induit une diminution du pourcentage en carbohydrates de (15,6% ± 0,08) à (14,02% ± 0,94) sous 30 et 75 PSU respectivement. Des résultats similaires sont rapportés par Chen et Jiang (2009) sur la microalgue marine *Dunaliella sp* due à une diminution de la teneur en amidon intracellulaire, ainsi qu'à une augmentation de la teneur lipidiques (Afify *et al.*, 2010). Ce résultat permet d'induire la salinité comme étant la méthode la plus simple et la plus écologique stimulant la production du biodiesel (Keyuri *et al.*, 2016).

Le déséquilibre ionique et l'inactivation enzymatique dues au stress salin, affectent également plusieurs processus métaboliques, tels que la fixation du carbone, la photosynthèse, la respiration ainsi que la synthèse de pigments. En effet, la synthèse des pigments est l'un des processus les plus touchés (Pal *et al.*, 2011), la concentration en Chlorophylle a de la culture exposée à 30 PSU (3,44% ± 0,006) est significativement ($p \leq 0,05$) plus importante que celle enregistrée sous 75 PSU (2,80% ± 0,01). L'effet contraire est noté pour les caroténoïdes qui atteignent des pourcentages égaux à (0,206% ± 0,01) et (0,246% ± 0,002) sous 15 et 75 PSU respectivement.

Constitutifs de la biomasse microalgale, les macronutriments sont les éléments que toute microalgue requiert en quantité importante (supérieure à 1% de la masse sèche) à savoir C, N, O, H, P, Ca, Mg, S, K. Les éléments nécessaires à la croissance microalgale sont en effet divisés en deux catégories en fonction de la quantité nécessaire par gramme de biomasse produite : les macronutriments (quantité supérieure à 10 mg. g⁻¹ de biomasse) et les micronutriments (quantité inférieure à 10 mg.g⁻¹ de biomasse) (Conan *et al.* 2007).

Le carbone est l'élément majoritaire qui constitue la biomasse, il représente environ la moitié de la masse sèche de la microalgue. En culture autotrophe, il est apporté dans le milieu sous forme de sels inorganiques dissous dans le milieu de culture (HCO_3^- ou CO_3^{2-}) ou sous forme gazeuse (CO_2) transférés à la culture (Artu., 2016).

En effet, le carbone est essentiel à la synthèse de toutes les composantes organiques nécessaires à la croissance. Il est généralement admis qu'un kilo de microalgues absorbe entre 1,65 et 1,8 kg de CO_2 (Doucha et al., 2005).

Au cours de cette étude les souches adoptent un comportement variable vis-à-vis de la concentration en bicarbonate de sodium, la souche *N gadingana* tolère des concentrations en bicarbonate de sodium variant de 5,95 à 23,81 mM avec un optimum sous 23,81 mM ($491 \pm 1 \times 10^5$ cellule/ml), Yim et al en 2003 confirment que pour augmenter la croissance cellulaire, le CO_2 (source de carbone) peut aussi être apporté en suppléments au milieu de culture, sous forme de $NaHCO_3$, à titre d'exemple, un enrichissement du milieu pour la souche *Gyrodinium pudicum* à hauteur de 50 μ M permet d'augmenter jusqu'à 2,3 fois la biomasse finale, au-delà de cette valeur seuil la croissance diminue. La microalgue verte d'eau douce *T brasiliensis* ne tolère qu'une supplémentation égale à 0,5 g/l (5,95 mM) avec un taux de croissance de $0,321 J^{-1} \pm 0,001$ et une biomasse maximale de $398,33 \times 10^5$ cellule/ml $\pm 2,12$ est un milieu exempt de $NaHCO_3$ pour *Scenedesmus sp.* ($0,317 \pm 0,004 J^{-1}$) contre ($0,200 \pm 0,001 J^{-1}$) après ajout de 2 g/l (23,81 mM) de bicarbonate de sodium.

Les auteurs ne donnent pas d'explication permettant de corréler la teneur en carbone et la production optimale de biomasse. Cependant d'autres auteurs expliquent ce phénomène par un effet inhibiteur du CO_2 sur la croissance à partir d'une concentration critique (concentration seuil tolérée par les cellules). Selon Yang and Gao (2003) la valeur de la concentration critique dépend de plusieurs paramètres : l'approvisionnement en carbone, l'affinité des cellules pour celui-ci, le taux de croissance, la taille des cellules (plus la croissance des cellules est rapide, plus elles exigeront des concentrations élevées de CO_2) et la présence d'anhydrase carbonique chez certaines microalgues (Andersen, 2005).

Huang et al (2012) ont observé une augmentation de la production de biomasse de *Desmodesmus* de 20% lorsque la teneur en CO_2 passait de 0,038% (teneur atmosphérique) à 2%. Les microalgues du genre *Chlorella* sont également CO_2 tolérantes, elles peuvent se développer dans un milieu contenant jusqu'à 70% de CO_2 , en produisant de 0,71 à 0,76 g/l de biomasse (après 6 jours de culture) avec une croissance maximale en présence de 10% de CO_2 (5,7 g/l après 6 jours de culture).

Les pourcentages en protéines corrélaient parfaitement avec la croissance cellulaire et ce pour toutes les souches ($36,07\% \pm 4,34$) sous 2 g/l pour *N gadingana*, ($41,30\% \pm 10,41$) sous 0,5 g/l pour *T brasiliensis* et ($43,64\% \pm 1,17$) sous milieu F/2 Guillard pour *Scenedesmus sp.*

Les pourcentages en carbohydrates et en lipides (produits biochimiques à grande valeur ajoutée) enregistrés en fin de la phase exponentielle augmentent sous des milieux supplémentés de 2 g/l (23,81 mM) de $NaHCO_3$ avec des valeurs en carbohydrates égales à ($16,92\% \pm 0,82$), ($25,35\% \pm 3,53$) et ($22,10\% \pm 1,30$) pour *N gadingana*, *T brasiliensis* et *Scenedesmus sp.* respectivement et des pourcentages de ($37,8\% \pm 0,12$), ($21,27\% \pm 0,71$) et ($21,08\% \pm 0,59$) pour *N gadingana*, *T brasiliensis* et *Scenedesmus sp.* respectivement en lipides. Effectivement la disponibilité et l'approvisionnement en carbone constituent un régulateur métabolique clé qui régit la synthèse des carbohydrates et des lipides chez les microalgues (Fan et al., 2012). Il a récemment été démontré que l'ajout de bicarbonate de sodium était une stratégie viable pour augmenter l'accumulation de lipides dans les chlorophytes marines (Srinivasan et al., 2015). De plus la disponibilité d'une source de carbone inorganique entraîne l'activation de la Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase / oxygénase (RuBisCO) qui est une enzyme clé pour la conversion du 3-phosphoglycérate, un substrat pour la biosynthèse des carbohydrates et des acides gras des microalgues (Peng et al., 2014).

L'ajout du bicarbonate de sodium permet également l'augmentation des pourcentages en pigments photosynthétiques à savoir la Chlorophylle a, la Chlorophylle b ainsi que les caroténoïdes (Pancha *et al.*, 2015). Des résultats semblables au nôtre ont été enregistrés par White *et al.*, (2013) qui ont noté une augmentation de 2,24 et 1,91 fois du contenu de Chlorophylle a chez *Tetraselmis suecica* et *Nannochloropsis salina* respectivement, cultivées sous 1 g/L de suppléments comparée aux cultures exemptes de bicarbonate.

Ces macromolécules provenant de micro-algues ont un potentiel biotechnologique considérable, notamment pour la production de substances précieuses pour les industries des additifs alimentaires, des cosmétiques et des produits pharmaceutiques.

Après le carbone, l'azote et le phosphore sont quantitativement les éléments les plus importants de la biomasse phytoplanctonique naturelle. Ces trois éléments entrent dans sa composition selon un rapport moyen de 106 :16 :1, identifié par Redfield (1934).

Le second élément le plus important quantitativement après le carbone est l'azote (sans compter l'hydrogène et l'oxygène obtenus de la photolyse de l'eau ou par consommation de l'oxygène dissous). Élément essentiel à la synthèse de protéines et des pigments photosynthétiques, l'azote peut être apporté sous différentes formes. Le plus souvent apportés sous forme de sels minéraux, les ions ammonium, nitrate ou encore nitrite peuvent être assimilés directement par les microalgues (en fonction des espèces). L'azote peut aussi être apporté sous forme organique (exemple de l'urée) ou chez certaines cyanobactéries (*Anabaena*, *Nostoc*...) directement sous sa forme gazeuse (N_2) (Bhola *et al.*, 2010).

Étant donné que la source d'azote favorable pour la croissance est différente d'une espèce à l'autre, une comparaison s'impose dans le but de sélectionner la sources d'azote la plus appropriée à chaque espèce et maximiser ainsi la productivité du produit cible. Nous avons donc substituer la source d'azote ($NaNO_3$) constitutive du milieu de culture *F/2* Guillard par différentes sources d'azote organique et inorganique à savoir (NH_4Cl , NH_4OH , $NaNO_3$, CH_4N_2O et un mélange de toutes ces sources) à concentration égale d'azote (8,82 mM (123,5 mg N/l)) et testé leur effet sur la croissance ainsi que la composition biochimique des souches étudiées, Au début de l'expérience la croissance cellulaire de *N. gaditana* est faible et est maintenue dans un état stable de J_1 à J_2 pour toute les sources de nitrogène avec une phase de latence plus longue (3jours) pour CH_4N_2O , les valeurs moyennes des concentration cellulaire maximale variant de $292,5 \pm 21,16$ à $420,5 \pm 13,43$ millions cellules/ml. Quelle que soit la source de nitrogène utilisée, la souche révèle une bonne croissance avec une préférence significative ($p \leq 0,05$) pour le chlorure d'ammonium ($0,327 \pm 0,01 \text{ j}^{-1}$). En effet, La plupart des microalgues peuvent utiliser diverses formes d'azote, y compris les sources d'azote sous forme de nitrate, nitrite, ammonium, ou bien des sources organiques telles que l'urée (Becker, 1994) ; chaque source d'azote est d'abord réduite à la forme ammonium et assimilée en acides aminés à travers une variété de voies (Cai *et al.*, 2013). L'ammonium est généralement préféré par de nombreuses souches de microalgues, car son assimilation nécessite moins d'énergie (Ruangsomborn, 2015). L'urée assure aussi une bonne productivité avec un taux de croissance égal à ($0,299 \pm 0,005 \text{ j}^{-1}$) ce qui peut être très avantageux car ce dernier constitue une source d'azote organique peut coûteuse, et facilement utilisable après dégradation en ammonium ou en bicarbonate via l'uréase (Solomon and Gilbert, 2008).

Les deux autres souches (*Scenedesmus sp.* et *T. brasiliensis*) affichent une nette préférence pour le $NaNO_3$ la forme la plus fréquente dans l'environnement de par sa stabilité (Falkowski et Raven, 2007), avec des taux de croissance variant de $0,264 \pm 0,02 \text{ j}^{-1}$ à $0,276 \pm 0,018 \text{ j}^{-1}$ pour *Scenedesmus sp.* et *T. brasiliensis* respectivement, tandis que la croissance est presque nulle en utilisant le chlorure d'ammonium, cela correspond au résultats noté par

Vidyashankar et *al.* (2013) qui confirment que la microalgue *Scenedesmus* favorise l'utilisation d'azote sous forme de nitrates de sodium et d'acétate d'ammonium, tandis qu'elle affiche une croissance moins importante en utilisant de l'urée (la quantité de biomasse produite est divisée par 2,5). De telles observations sont aussi notées par d'autres chercheurs travaillant sur diverses espèces de microalgues (Dayananda et *al.*, 2005 ; Liang et *al.*, 2006 ; Arumugam et *al.*, 2013).

Kim et *al.* en 2016 signalent que la composition biochimique peut également être modifiée ou influencée par la source d'azote ainsi que la durée de la culture, ce qui explique nos résultats.

D'après les résultats obtenus chez *Scenedesmus abundans* par Tahiri et *al.*, (2000), la teneur en protéines n'est pas affectée de manière significative par la nature de la source azotée utilisée. Cependant, sur le plan qualitatif les microalgues cultivées en présence de nitrate présentent une meilleure composition biochimique globale. Ces observations sont en accord avec les travaux de Piorreck et *al.*, (1984) sur *Chlorella vulgaris* et *Scenedesmus obliquus*, bien que les effets des différentes sources d'azote n'aient pas été dissociés des variations de pH qu'elles induisent. Il est actuellement bien établi que l'absorption des ions NO_3 induit une alcalinisation du milieu de culture alors que celle des ions NH_3 entraîne au contraire une acidification de celui-ci (Goldman and Brewer 1980). Ainsi, en milieu non tamponné, les observations effectuées reflètent à la fois les effets du pH sur la croissance et/ou le degré d'efficacité des différentes formes azotées. D'une manière générale, des études récentes ont montré que les variations de la composition biochimique sont plus ou moins spécifiques et dépendent de la capacité de chaque espèce à se développer sur tel ou tel type de source azotée (Fidalgo et *al.*, 1998).

Le chlorure d'ammonium s'avère être la source de nitrogène la plus adéquate pour l'accumulation du plus grand pourcentage en pigments chez la microalgue marine *N gaditana* avec des valeurs égales à $3,64\% \pm 0,006$ en chlorophylle a, Roopnarain et *al.*, (2015) ont confirmé que les pigments chlorophylliens étaient significativement plus élevés en utilisant l'ammonium comme source de nitrogène comparé au nitrate et à l'urée.

Cette étude a été poursuivie en étudiant l'effet de différentes concentrations en azote (17,64 ; 8,82 ; 6,61 ; 4,41 et 2,20 mM).

Suite aux résultats obtenus il est apparu évident que les deux souches *N gaditana* ($0,320 \pm 0,002 J^{-1}$) et *Scenedesmus sp.* ($0,326 \pm 0,0005 J^{-1}$) présentaient une meilleure croissance sous une concentration élevée en azote (17,64 mM), contrairement à *T brasiliensis* qui enregistre le meilleur taux de croissance sous 8,82 mM concentration initiale du milieu F/2 Guillard ($0,342 J^{-1} \pm 0,003$). Selon Dragone, 2011 l'augmentation de la concentration d'azote dans le milieu entraînerait une augmentation de la biomasse, de la quantité de protéines et de chlorophylles par cellule, mais ceci jusqu'à une certaine concentration d'azote au-dessus de laquelle l'effet s'inverse. Une carence en azote provoque à l'unanimité la baisse de la croissance cellulaire et ce pour toutes nos souches et enregistre de ce fait des taux de croissance maximales égaux à $0,245 J^{-1} \pm 0,001$, $0,200 J^{-1} \pm 0,002$ et $0,241 J^{-1} \pm 0,001$ pour *N gaditana*, *T brasiliensis*, *Scenedesmus sp.* respectivement.

L'azote intracellulaire se répartit en une diversité de molécules organiques (acides aminés, peptides, protéines de structure ou enzymatiques, acides nucléiques, chlorophylles...) et inorganiques (nitrate, nitrite, ammonium), qui peuvent être catabolisées pour satisfaire la demande d'autres voies métaboliques plus prioritaires lorsque l'azote devient limitant : les cellules consomment d'abord les réserves d'azote inorganique puis les acides aminés libres, une part des protéines et enfin l'ARN (Lavin and Lourenco, 2005).

La diminution de l'azote dans le milieu entraîne une baisse de la capacité photosynthétique de la cellule, qui diminue la capacité de la cellule à utiliser l'énergie lumineuse captée pour la transformer en produits carbonés et rend alors les microalgues plus susceptibles de subir le phénomène de photoinhibition (Boileau, 2015). Pour la production de protéines, l'assimilation de l'azote s'accompagne de la synthèse de glutamate, à l'aide de traceur radioactif (^{14}C). Il a été démontré que cette réaction mobilise des intermédiaires du cycle de Krebs. La cellule a donc besoin de pyruvate pour faire fonctionner ce cycle ; celui-ci est synthétisé à partir du glucose, produit de l'activité photosynthétique (Larosiere, 2012), ce qui explique la diminution du pourcentage en protéines ainsi que le taux de croissance des trois souches étudiées sous carence azotée.

En revanche il existe une relation inverse entre la teneur en lipides et la concentration en azote, nous notons une augmentation en pourcentage de lipides au fur et à mesure que la carence en azote s'accroît pour atteindre des valeurs égales à ($37,34\% \pm 0,45$), ($20,28\% \pm 0,57$) et ($23,89\% \pm 0,36$) pour *N gaditana*, *T brasiliensis*, *Scenedesmus sp.* respectivement.

Cette augmentation significative ($p \leq 0,05$) de la teneur en lipides cellulaires étant attribuable au schéma inhabituel des lipides avec la capacité d'adapter efficacement leur métabolisme lipidique en réponse aux changements des conditions de culture (Guschina and Harwood, 2006), on retrouve donc une réponse typique d'une culture sous carence azotée.

Les pourcentages en carbohydrates de la souche *Scenedesmus sp.* augmentent également en accentuant la carence azotée pour atteindre un maximum ($24,07\% \pm 3,76$) sous ($2,20 \text{ mM}$). En effet, si les cellules sont limitées en azote, elles accumulent plus de réserves glucidiques, le glucose est dirigé préférentiellement vers la formation d'amidon, au lieu de fournir les précurseurs carbonés nécessaires à la synthèse des acides aminés, éléments de base des protéines (Larosiere, 2012). De plus la fixation de carbone est en déséquilibre par rapport à l'assimilation limitée de l'azote pourtant nécessaire à la croissance des microalgues. L'excès de carbone qui en est issu est détourné de la synthèse des protéines dans des composés de stockage tels que les glucides ou les lipides pour les microalgues oléagineuses (Taleb, 2015).

Nos résultats montrent clairement une forte diminution de la concentration des chlorophylles a sous carence, ce qui est souvent expliqué par le rôle de la chlorophylle a dans le stockage interne de l'azote. Les cellules dégradent leur chlorophylle pour soutenir la division cellulaire et par conséquent maintenir une croissance dans ces conditions spécifiques de culture (Van Vooren et al., 2012 ; Kandilian et al., 2014).

Le phosphore est lui aussi un élément essentiel à la croissance microalgale. Bien que représentant généralement moins d'un pour cent de la masse sèche de la microalgue, cet élément est majeur, notamment dans le transfert d'énergie au sein de la cellule (production d'ATP par exemple). Sa forme majeure assimilée est la forme inorganique (HPO_2^- , H_2PO_4^- noté aussi Pi) (Taleb, 2015).

Afin d'évaluer l'effet de la concentration en phosphate, nous avons cultivé nos souches sous un intervalle variant de $0,726 \text{ mM}$ à $0,09 \text{ mM}$. Les courbes de croissance sont établies en effectuant un comptage cellulaire quotidien : nous observons une augmentation significative ($p \leq 0,05$) de la biomasse cellulaire à mesure que nous augmentons la concentration de phosphate avec un taux de croissance maximal égal à $0,347 \text{ J}^{-1} \pm 0,0005$, $0,342 \text{ J}^{-1} \pm 0,001$ et $0,332 \text{ J}^{-1} \pm 0,001$ sous $0,726 \text{ mM}$ pour *N gaditana*, *T brasiliensis* et *Scenedesmus sp.* respectivement. Cette expérience démontre donc l'effet positif du phosphate sur la croissance des microalgues, ce qui est en corrélation avec les résultats rapportés par Steffii en 2003. En effet le phosphore entre dans la synthèse des acides nucléiques et des phospholipides (constituants des membranes cellulaires), ainsi que dans la constitution des molécules du métabolisme énergétique, l'ATP et le NADPH (Bougaran et al., 2010), Il va

donc intervenir au cours de nombreux processus métaboliques (Chen et *al.*, 2011). Il est aussi nécessaire pour satisfaire les besoins énergétiques et de biosynthèse des organites (Moseley et *al.*, 2006). De plus, il a été démontré chez certaines microalgues, qu'une limitation en phosphore dans le milieu induisait la synthèse d'une enzyme extracellulaire, une phosphatase, capable de cliver des molécules phosphorylées sur des composés organiques présents dans le milieu, permettant ainsi à la cellule de pallier ce manque (Moseley et *al.*, 2006 ; Spijkerman, 2007). Chez *Chlorella vulgaris* (Kozłowska et *al.*, 2004), il a été noté que les cellules déficientes en phosphore, augmentaient la production de glycolate via le mécanisme de photorespiration permettant ainsi la dissipation de l'énergie absorbée en excès par le photosystème et évitant ainsi d'endommager la cellule. Cependant, les mécanismes de régulation du manque de phosphore par la cellule restent peu connus (Moseley et *al.*, 2006).

Selon nos résultats une carence en phosphate induit la diminution des pourcentages en protéines, mais stimule en parallèle la production en lipides et carbohydrates, bien évidemment la carence en phosphore joue sur l'activité photosynthétique principalement au niveau de la fonction de l'enzyme « *rubisco* », indispensable à la fixation du CO_2 (Agren, 2004), sur l'accumulation des réserves lipidiques (Wang et *al.*, 2008), et va également entraîner une baisse de la biomasse, de la quantité de chlorophylle, de polysaccharides et de protéines cellulaire (Persic et *al.*, 2009), ainsi qu'une dénaturation de l'appareil photosynthétique en diminuant le transport des électrons au niveau du PSII (Zer and Ohad, 2003).

Nous observons une augmentation significative du pourcentage en carbohydrates et en lipides en corrélation avec la diminution en concentration de phosphate : effectivement la limitation en phosphore aboutit généralement à une augmentation du contenu en carbohydrates (Myklestad, 2000), et ce chez plusieurs groupes phytoplanctoniques comme les prymnesiophyceae (Alderkamp et *al.*, 2007), les cryptophyceae (Da Silva et *al.*, 2009) ou encore les diatomées (Granum et *al.*, 2002). Cette augmentation résulte d'une moindre utilisation des carbohydrates qui continuent à être produits par les processus photosynthétiques qui perdurent, bien qu'ils puissent être eux-mêmes affectés par la limitation en sels nutritifs. Certains éléments, tels que le phosphore, vont alors être indispensables pour l'utilisation des carbohydrates.

Mahat et *al.*, 2015 rapportent aussi que les pourcentages de lipides produits diminuent à mesure que la quantité de phosphate augmente. La plus grande quantité de lipides produite était obtenue lorsque les micro-algues étaient cultivées sous 0,1 g/L de phosphate (sous carence phosphatée).

Les microalgues possèdent donc un potentiel biotechnologique évident, la phycculture est une activité jeune et pleine de promesses. Son essor doit être accompagné par un effort de recherche, afin d'en réduire les coûts de production et de fiabiliser les rendements des cultures à l'échelle industrielle. Les technologies de culture sont déterminantes pour la rentabilité économique des productions phytoplanctoniques. Une fois que l'effet des différents paramètres physico-chimiques est établi, des verrous subsistent, les milieux de culture destinés à la production de la biomasse microalgale impliquent des coûts élevés, ce qui contrebalance sur le plan économique les forts rendements. Pour être compétitif le coût de production des microalgues devrait approcher 0,38 euro par litre d'huile quand les estimations actuelles se situent plutôt aux environs de 2,24 euros/L. En vue de réduire ces montants, des efforts de recherche respectueuse de l'environnement doivent être consentis (Bougaran and Saint-Jean, 2014).

Les microalgues ont la capacité de croître sur une vaste gamme d'effluents. La littérature scientifique rapporte un grand nombre de gisements auxquels les microalgues furent confrontées avec succès : eaux résiduaires urbaines, effluents industriels comme les digestats (Levine *et al.*, 2011) ou encore les lixiviats de décharges (Eminenour-Muzalina *et al.*, 2011 ; Lin *et al.*, 2007 ; Richards *et al.*, 2013) ainsi que les effluents d'élevages (Mulbry *et al.*, 2008).

En parallèle, le développement de l'aquaculture et singulièrement celui de la pisciculture est désormais reconnu comme inéluctable pour faire face à la demande croissante en produits aquatiques 1,69 millions de tonnes de poissons ont été produits en 2011, soit 215 % de plus par rapport à 2001. Néanmoins ce développement pose un certain nombre de questions relatives à l'impact de ce type de production sur le milieu aquatique en engendrant une forte eutrophisation.

Il est admis qu'une importante partie de cet impact est d'origine nutritionnelle, les rejets pour l'essentiel constitués d'aliments non consommés, de fèces et des produits d'excrétion enrichissent le milieu aquatique : en effet, 72% de l'azote et 70% du phosphore contenus dans l'aliment utilisé pour les élevages de poissons sont rejetés dans l'environnement.

Il apparaît donc intéressant d'en tirer profit et notamment de rechercher à utiliser et valoriser cet enrichissement en nutriments (N et P), de façon à orienter la production végétale vers des microalgues particulières, qui auront un double rôle : traiter les eaux enrichies des élevages et servir de biomasse pour différentes applications en parallèle (Hussenot, 2004).

L'aquaculture multitrophique intégrée (IMTA) vise justement ces objectifs en associant la culture d'espèces d'élevage et celle d'espèces extractives qui utilisent pour se nourrir les matières inorganiques et organiques issues de la pisciculture car la culture de micro-algues sur des milieux commerciaux est une opération très coûteuse. Les espèces extractives produisent ainsi une précieuse biomasse.

C'est dans ce contexte que s'insère notre thématique visant à mettre en relief, autant que possible l'effet d'un milieu effluent de piscicultures intensives provenant d'un élevage de *Tilapia O. niloticus* considéré comme étant un des poissons les plus largement cultivé dans le monde sur la croissance de trois souches de microalgues. D'autres paramètres tels que le pH, la température ainsi que l'intensité lumineuse des effluents ont été ajustés.

Les prélèvements des milieux effluents sont effectués tous les trois jours puis analysés en mesurant : le pH, la demande chimique en oxygène, la conductivité, la teneur en nitrite et nitrate ainsi que celle des orthophosphates et phosphate. Il s'avère donc que l'azote a été fourni par les effluents sous forme de nitrates, de nitrites et sels d'ammonium par les effluents, des formes facilement assimilables par les microalgues.

En outre, le phosphore un élément clé pour une croissance favorable des micro-algues a été trouvé naturellement sous forme de minéraux (orthophosphates et phosphate).

Par la suite nous avons comparé la croissance ainsi que la composition biochimique (protéines, carbohydrates et pigments) immédiate de nos trois souches de microalgues cultivées sous effluents de pisciculture et en milieu conventionnel F/2 Guillard.

Dès le 6^{ème} jour l'effluent brut arrive à assurer une croissance supérieure à celle enregistré sous milieu synthétique F/2 Guillard, dont le coût d'achat revient à 25 dinards/L, se qui constitue un substrat de croissance très peu coûteux, voire gratuit pour nos microalgues. Ces résultats concordent parfaitement avec ceux obtenues par (Sirakov and Velichkova., 2014) pour les souches *Nannochloropsis oculata* et *Tetraselmis* cultivées sur effluent d'aquaculture.

L'effluent du 3^{ème} jour nécessite quelques ajustements afin de satisfaire les besoins de nos souches en nutriments, d'après Boileau (2015), l'ajout de certains minéraux est nécessaire pour soutenir une croissance dans les effluents. L'ajout d'une source de phosphore est essentiel et l'ajout d'azote complémentaire permet d'obtenir de meilleurs rendements de croissance. Avec l'ajout de ces deux sources, il est possible d'atteindre une croissance supérieure à celle obtenue dans un milieu F/2 Guillard complet.

Néanmoins parmi les 25 milieux étudiés, il ressort que l'effluent du 6^{ème} jour additionné de vitamines permet d'obtenir les meilleurs résultats en termes de croissance cellulaire. En effet un certain nombre de composés organiques sont identifiés comme des facteurs de croissance indispensables pour certaines espèces incapables de les synthétiser. La cobalamine (vitamine B12) est fréquemment citée ainsi que la thiamine (vitamine B1) et la biotine (vitamine B7) (Croft *et al.*, 2006 ; Droop, 2007).

La croissance est ralentie au 12^{ème} jour, l'assimilation de la forme nitrate nécessite l'intervention d'un complexe enzymatique qui peut se trouver saturé lors d'importants flux de nutriments. Ce phénomène de saturation semble observable avec une limite maximale de l'élimination de l'azote quel que soit le flux apporté aux microalgues, des rééquilibrages en nutriments sont nécessaires en particulier pour augmenter la production.

Effectivement, l'azote est contenu surtout dans les protéines de l'aliment. La digestion transforme les protéines alimentaires en petits peptides et acides aminés qui, absorbés par l'intestin sont transportés par le sang vers le foie et les cellules (de la Noüe and Ouellet, 1992).

Le contenu en protéines de l'aliment influencera donc directement les rejets azotés des poissons. De l'azote ingéré, de 30 à 50 % sont retenus pour la croissance, de 40 à 60 % sont excrétés sous forme dissoute, tandis que de 10 à 25 % se retrouvent dans les fécès (de la Noüe and Ouellet, 1992).

Les déchets métaboliques azotés sont constitués principalement de l'ammoniac qui est excrété surtout par les branchies et présent dans l'urine. Une petite fraction d'azote (5 à 15%) est aussi excrétée sous forme d'urée. Tous les auteurs s'entendent pour dire que l'excrétion d'ammoniac se fait principalement par diffusion passive sous forme de NH_3 (Kaushik and Cowey, 1991).

De nombreux paramètres influencent la production de rejets azotés par les poissons : la forme d'excrétion d'azote et la quantité varient beaucoup selon les espèces, la température, la salinité, l'entassement des poissons et d'autres facteurs de stress. La quantité d'azote excrétée sous forme d'ammoniac diminue avec l'augmentation de la taille des poissons. La quantité d'aliments ingérés et le taux d'azote de la ration sont les éléments déterminants de la production d'ammoniac. Une augmentation de la quantité de lipides dans la ration permet aussi une diminution de l'excrétion d'azote, puisque les protéines sont alors moins utilisées comme source d'énergie. Azevedo *et al.*, (1998) ont montré qu'une augmentation de la température (de 6 à 15°C dans leurs expériences) a amené à une augmentation de la digestibilité apparente de la matière sèche, de l'azote et de l'énergie. Ceci a amené une réduction d'environ 40% de l'excrétion des déchets solides totaux et azotés, mais l'excrétion des déchets azotés dissous n'a pas été affectée. De façon générale, de 18 à 29% de l'excrétion des déchets azotés étaient sous forme solide, et de 71 à 82% sous forme dissoute.

Tout le phosphore nécessaire aux poissons provient de leur alimentation. Il peut être d'origine animale (farine d'os, farine de poisson), végétale ou minérale. Sa digestibilité est très variable selon les espèces et son origine. Le phosphore d'une farine de poissons de bonne qualité est digestible à 60 % par la truite arc-en-ciel (Dosdat, 1992). Par contre, le phosphore

d'origine végétale est sous forme de sels de calcium et de magnésium de l'acide phytique (aussi appelés phytate). Ce phosphore est très peu utilisable par les poissons (de 0 à 20%) parce qu'ils n'ont pas l'enzyme phytase nécessaire pour les digérer (Lall, 1991 ; Dosdat, 1992).

Le phosphore ingéré est retenu par le poisson dans des proportions assez variables, selon la digestibilité de celui-ci dans l'aliment. Ainsi, Dosdat (1992) affirme que le taux de rétention ne dépasse pas 30%, et qu'il s'établit en moyenne à 20%. L'évacuation du phosphore se fait par le rein dans l'urine sous forme de phosphate inorganique et par les fèces sous forme particulière à partir de la nourriture non digérée. Plusieurs auteurs rapportent que le phosphore excrété par le poisson se retrouve à environ 65 à 70% lié aux particules (fèces, aliment non consommé) (Axler et *al.*, 1997).

Ces effluents doivent en parallèle assuré un milieu adéquat à la croissance des poissons, en effet, les organismes aquatiques dépendent pour leur croissance et leur reproduction de la qualité des eaux dans lesquelles ils vivent. En général, la qualité des eaux est déterminée sur la base de critères quantitatifs et qualitatifs tels que la présence en quantités suffisantes de certains nutriments, la teneur en oxygène, le pH, la température ou encore, la présence de substances connues pour leur toxicité (métaux, pesticides, phénols, etc.).

Les paramètres indicateurs de la qualité de l'eau piscicole sont mesurés selon les méthodes normalisées.

Nous nous sommes référés dans ce travail aux normes européennes concernant la qualité des eaux douces pour être aptes à la vie des poissons par la directive 2006/44/CEE et 2006/113/CE et aussi aux normes marocaines de qualité des eaux piscicoles (décret n°2027-03 du 5 novembre 2003) (Annexe V). (Boulahai et Kalthoum Zerrouki., 2014). Il s'avère donc que les effluents du 1^{er}, 3^{ème} et 6^{ème} jour sont adéquats et conforme aux normes, et constitue un milieu favorable à la croissance microalgale et celle des poissons d'élevage à la fois, ce qui représente une alternative économiquement viable.

IV.2. Conclusions et perspectives

Les microorganismes photosynthétiques s'affirment comme l'une des alternatives convenables pour remplacer les énergies fossiles et suscitent un intérêt grandissant, en raison de leurs propriétés biologiques et métaboliques intéressantes, en particulier les microalgues qui se sont progressivement imposées dans les mondes scientifique et industriel.

En effet, depuis quelques années, la biotechnologie microalgale est devenue un thème de recherche privilégié permettant d'explorer et d'exploiter l'énorme potentiel de ces microorganismes intervenant au sein de nombreux systèmes et dans de multiples secteurs industriels (Daoud, 2013). L'intérêt de ces micro-organismes photosynthétiques réside également dans l'étendue de la palette de molécules qu'ils peuvent produire, telles que les protéines, les pigments ou encore les vitamines (Combe, 2016).

De nos jours, il existe entre 200 000 et 1 000 000 d'espèces différentes de microalgues, dont seules 30 000 sont connues et une dizaine d'espèces, étudiées et cultivées (Bernardo, 2012), une telle diversité non exploitée constitue un réel potentiel pour la recherche et l'industrie. Néanmoins, il reste encore des verrous à lever, via des recherches en amont, avant que les rendements et les coûts espérés ne soient effectivement atteints et que ces technologies ne puissent voir le jour à grande échelle (Cadoret et *al.*, 2008).

Le choix et la mise en culture d'une souche de microalgues qui permettent à la fois d'obtenir un taux de croissance satisfaisant et un contenu intéressant sur le marché doivent satisfaire

à des critères essentiels. La souche sélectionnée devrait posséder, autant que possible, les caractéristiques suivantes :

- Productivité élevée de biomasse ;
- Productivité élevée du produit valorisé ;
- Capacité élevée de fixation du CO_2 , en autotrophie ;
- Capacité élevée d'utilisation de la lumière, en autotrophie ;
- Capacité d'utilisation d'une source de glucose peu dispendieuse et largement disponible, en hétérotrophie ;
- Capacité de dominance sur les espèces indigènes en système ouvert ;
- Tolérance à une large gamme de température, suivant les variations diurnes et saisonnières.

Pour le moment, aucune souche connue ne répond à tous ces critères. Le choix d'une espèce se fait d'abord en sélectionnant des espèces ayant un taux de croissance cellulaire rapide, afin d'atteindre de fortes productivités en biomasse. Ensuite, selon le mode de culture et le produit ciblé, d'autres critères entrent en considération. La souche doit être résistante aux conditions de cultures imposées et à la contamination, et capable de synthétiser une quantité appréciable du produit recherché. La sélection de la souche dépend notamment des produits et coproduits visés, par exemple, une espèce fortement productrice de lipides est intéressante dans un contexte de production de biodiesel. La sélection d'une souche pourra influencer les choix technologiques pour sa production, la récolte de la biomasse et le conditionnement de celle-ci pour en extraire les produits à haute valeur ajoutée.

En conclusion, trouver une telle souche « idéale » présentant toutes ces caractéristiques est une tâche très difficile, surtout si on considère la grande biodiversité des algues et le rôle important des conditions de culture (Taleb, 2015).

Pour croître, les microalgues sont tributaires de plusieurs facteurs de croissance, ainsi, et en fonction des objectifs de culture plusieurs paramètres peuvent s'avérer limitants :

- Les facteurs abiotiques tels que la source de carbone, les nutriments minéraux, la température, la salinité, le pH et la teneur en O_2 ;
- Les facteurs biotiques tels que les pathogènes (bactéries, champignons, virus).

Le présent travail a porté d'une part sur l'isolement et l'étude de souches algériennes isolées à partir d'un site très intéressant (l'estuaire de l'Oued Chélif) ainsi que l'optimisation des paramètres physico-chimiques (croissance cellulaire et composition biochimique). L'objectif principal et commun à toutes les études expérimentales et consiste donc à évaluer et étudier le rendement de production en masse de trois souches d'intérêt industriel pour la production d'une variété de molécules à haute valeur ajoutée (carbohydrates, protéines, lipides et pigments).

Les résultats obtenus ont souligné une grande différence au niveau du comportement des souches (microalgue marine/eau douce) en termes de croissance, de métabolisme et de fragilité cellulaire. Ces observations ont révélé la grande biodiversité des microalgues et mis en avant le défi de trouver la souche idéale, surtout lorsque l'application envisagée implique beaucoup de critères spécifiques comme dans le cas du biodiesel. Cet écart observé entre les souches au regard de chaque critère de criblage, renforce de plus l'idée qu'il est difficile de choisir une souche en se basant sur les données de la littérature scientifique, cela confirme le besoin d'une méthodologie de criblage robuste qui prendra en considération des critères allant de la production de quantités importantes de biomasse, jusqu'à l'étude de leur composition biochimique. En revanche les deux souches appartenant à la même famille et

provenant du même milieu d'isolement *Scenedesmus sp.* et *Tetranephris brasiliensis* présente une grande similitude.

Il n'y a pas d'avantage clair entre les microalgues d'eau douce et les microalgues d'eau de mer, chaque type a ses avantages et ses inconvénients et sera plus ou moins adapté à certaines régions. Si les cultures doivent être effectuées en eau douce, des conflits sur l'usage de l'eau peuvent apparaître. D'un autre côté, les couplages avec des sources de CO_2 ne seront pas systématiquement possibles en bord de mer ou devront être planifiés.

Il apparaît clairement que la croissance des microalgues est strictement influée par la lumière, en effet, dans le monde aquatique, la lumière, via le processus de photosynthèse, contrôle les flux de carbone et la production de molécules énergétiques dans les cellules et détermine donc le rendement de consommation des nutriments chez les photoautotrophes (Dubinsky and Schofield, 2010). La lumière est donc un paramètre clé, ainsi une limitation ou un excès de lumière vont donc avoir des répercussions sur le métabolisme des cellules et la croissance des populations microalgales.

Afin d'optimiser les protocoles les plus pertinents, il est impératif de concevoir et de développer des photobioréacteurs qui permettent une maîtrise poussée des paramètres de culture avec des géométries optimisées adaptées aux contraintes de la production : rentabilité du bioréacteur, la pureté d'algues produites, l'optimisation de l'espace et facilité de l'entretien.

Les systèmes de culture de type plat ont la particularité de présenter un important ratio surface sur volume important et une bonne qualité de transfert gazeux ce qui se traduit par un fort rendement photosynthétique. Pourtant, les limitations sont nombreuses et concernent essentiellement l'augmentation des coûts de production suite à la ré-carbonatation des cultures après l'augmentation du pH et des phénomènes de colmatage. De plus, le faible ratio entre surface de refroidissement et surface exposée à la source lumineuse peut induire un mauvais contrôle de la température. Aussi, la présence de zones à faible mélange (coins) affecte aussi les rendements (Daoud., 2013).

Tous les résultats expérimentaux obtenus prouvent clairement que le mode de culture ainsi que la limitation en azote et en phosphate affectent considérablement la physiologie cellulaire et par conséquent la composition biochimique de la culture. Ainsi une réponse typique de la cellule à une carence azotée et phosphatée se résume par une accumulation des carbohydrates et des lipides, au détriment des protéines et des pigments. Néanmoins, la production de lipides par ajout de $NaCl$ peut être plus pratique et écologique que celle induite par des carences.

En comparant la croissance photosynthétique des souches sous conditions de culture (optimales et défavorables), les résultats révèlent que les performances des souches sont fortement liées aux conditions de culture appliquées. Autrement dit, une croissance importante en conditions de croissance optimales n'implique pas forcément une bonne croissance lorsque les conditions deviennent défavorables comme c'est le cas lors d'une carence azotée, d'où l'importance d'étudier la croissance des souches dans les deux conditions de culture étant donnée leur influence sur les performances intrinsèques.

Les effluents de pisciculture chargés essentiellement en nutriments minéraux se révèlent favorables à la production de microalgues et à celle des poissons d'élevage sans engendrer d'inhibition significative. Néanmoins des rééquilibrages en nutriments sont nécessaires en particulier pour augmenter la production en biomasse.

Une telle étude construit une plateforme de départ pour évaluer d'autres axes de recherche, en effet avec leur nombre gigantesque et leur extrême diversité biologique, les microalgues

offrent un éventail impressionnant pour effectuer des synthèses chimiques de produits qui peuvent intéresser l'humanité.

Les réactions chimiques qu'elles effectuent naturellement utilisent l'énergie du soleil par la photosynthèse, considérablement plus économe en énergie que les procédés catalytiques habituels à nos industries. Pour exploiter ce potentiel, les laboratoires de biologie/chimie doivent comprendre en détail le fonctionnement de ces organismes afin de leur apporter éventuellement des modifications, et ce, en interaction avec les spécialistes du génie chimique pour mettre au point des réacteurs chimiques qui permettent de les exploiter et d'extraire les produits recherchés. Aujourd'hui, plusieurs productions industrielles utilisant les microalgues sont déjà rentables, des compléments alimentaires aux polysaccharides. Les travaux d'industrialisation progressent, et d'autres produits vont arriver, en particulier pour alléger les difficultés prévues dans la production d'énergie à partir des combustibles fossiles. De plus, il n'est sûrement pas erroné de penser qu'une production de microalgues offre une opportunité exceptionnelle, particulièrement pour les pays méditerranéens, de créer des filières alimentaires d'un type nouveau, depuis la production jusqu'à la transformation en ingrédients à haute valeur ajoutée.

Il serait aussi intéressant :

- D'effectuer des études complémentaires sur les différents systèmes de culture ;
- D'étudier les différentes interactions possibles entre les paramètres de culture physicochimique ;
- D'étudier avec plus de précision le profil lipidique des souches isolées ;
- De réaliser une modélisation structurée de la croissance cellulaire ;
- D'améliorer les souches par des techniques avancées de manipulations génétiques (OGM) ;
- De développer des partenariats industriels pour des applications biotechnologiques dans les domaines de l'énergie (biohydrogène, biodiesel), de la chimie verte et de la cosmétique ;
- D'identifier et caractériser les espèces microalgales, les procédés, les technologies et les business model d'intérêt pour la zone méditerranéenne ;
- De procéder à des scale up (projets pilotes, projets de démonstration) permettant de trier les espèces et de retenir les plus intéressantes du point de vue économique, social et environnemental ;
- De créer une banque de souches (dont éventuellement des souches pour les applications à visées industrielles) ou de mettre en réseau les banques de souches existantes.

Chapitre V - Bibliographie

- Adl S.M., Simpson A.G.B., Farmer M.A., Andersen R.A., Anderson O.R., Barta J.R., Bowser S.S., Brugerolle G., Fensome R.A., Fredericq S., James T.Y., Karpov S., Kugrens P., Krug J., Lane C.E., Lewis L.A., Lodge J., Lynn D.H., Mann D.G., Mccourt R.M., Mendoza L., Moestrup O., Mozley-Standridge S.E., Nerad T.A., Shearer C.A., Smirnov A.V., Spiegel F.W., Taylor M.F.J.R., 2005. The New Higher-Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* **52**: 399-451.
- Afify A.M.R., Shalaby E.A., Shanab S.M.M., 2010. Enhancement of biodiesel production from different species of algae. *GrasasAceites*, **61** (4): 416-422.
- Agren G. I., 2004. The C: N:P stoichiometry of autotrophs theory and observations. *Ecol. Lett.* **7**:185-191.
- Alcaine A.A., 2010. Biodiesel from microalgae. Final degree project. Royal School of Technology Kungliga Tekniska Högskolan, Stockholm, Sweden.
- Alderkamp A.C., Buma A.G.J., Van-Rijssel M., 2007. The carbohydrates of Phaeocystis and their degradation in the microbial food web. *Biogeochemistry*, **83**: 99-118.
- Allakhverdiev S.I., Nishiyama Y., Takahashi S., Miyairi S., Suzuki I. & Murata, N., 2005. Systematic analysis of the relation of electron transport and ATP synthesis to the photodamage and repair of photosystem II in *Synechocystis*. *Plant Physiol.* **137**: 263-273.
- Altschul SF., Madden TL., Schäffer AA., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman DJ., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, **5**: 3389-3402.
- Andersen R. A., Brett R. W., Potter D., Sexton J. P. 1998. Phylogeny of the Eustigmatophyceae Based upon 18S rDNA, with Emphasis on *Nannochloropsis*. *Protist*, **149**(1): 61-74.
- Andersen R.A., 1992. Diversity of eukaryotic algae. *Biodiversity and Conservation*, **1**(4): 267-292.
- Andersen R.A., 2005. Algal Culturing Techniques. *Elsevier Academic Press*, pp 239-287.
- Andrews J.F., 1968. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. *Biotechnology and Bioengineering*, **10**: 707-723.
- Apt K.E., Behrens P.W., 1999. Commercial developments in microalgal biotechnology. *J Phycol*, **35** :215-226.
- Artu A., 2016. Etude et optimisation de la culture de microalgues en photobioréacteurs solaires. *Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Nantes sous le sceau de l'Université Bretagne Loire Ecole doctorale de Sciences pour l'Ingénieur, Géosciences, Architecture Discipline : Sciences pour l'ingénieur Spécialité : Génie des Procédés Unité de recherche : Laboratoire GEPEA, UMR-CNRS 6144*
- Arumugam M., Agarwal A., Arya M.A., Ahmed Z., 2013. Influence of nitrogen sources on biomass productivity of microalgae *Scenedesmusbijugatus*. *BioresourceTechnol*, **131**: 246-249.
- Aslan S. & Kapdan I.K., 2006. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering*, **28**: 64-70.

- Babcock R W., Malda J., Radway J. C., 2002.** Hydrodynamics and mass transfer in a tubular airlift photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*, **14**: 169-184.
- Babu M.A., van der Steen N.P., Hooijmans C.M., Gijzen H.J., 2011.** Nitrogen mass balances for pilot-scale biofilm stabilization ponds under tropical conditions, *Bioresour. Technol.* **102**: 3754-3760.
- Badger M.R., Price G.D., 2003.** CO₂ concentration mechanisms in cyanobacteria: Molecular components, their diversity and evolution. *Journal of Experimental Botany*, **54(383)**: 609-622.
- Bajguz A., 2011.** Suppression of *Chlorella vulgaris* growth by cadmium, lead, and copper stress and its restoration by endogenous brassinolide. *Archives of environmental contamination and toxicology*, **60 (3)**: 406-416.
- Balsa-Canto E., Banga J.R., Alonso A.A., Vassiliadis V.S., 2001.** Dynamic optimization of chemical and biochemical processes using restricted second-order information. *Computers and Chemical Engineering*, **25**: 539-546.
- Banerjee A., Sharma R., Chisti Y., Banerjee U.C., 2002.** *Botryococcus braunii*: A renewable source of hydrocarbons and other chemicals. *Critical Reviews in Biotechnology*, **22**: 245-279.
- Banga J.R., Alonso A.A., Singh R.P., 1997.** Stochastic dynamic optimization of batch and continuous bioprocesses. *Biotechnology Progress*, **13(3)**: 326-335.
- Bannister T.T., 1979.** Quantitative description of steady state, nutrient-saturated algal growth, including adaptation. *Limnology and Oceanography*, **24 (1)** : 76-96.
- Baquerisse D., 1999.** Utilisation de la simulation dynamique des procédés pour la conduite et le contrôle commande des bioréacteurs. Thèse Doctorale, Ecole Centrale Paris, France.
- Beardall J., Stojkovic S., 2006.** Microalgae under global environmental change: implications for growth and productivity, populations and trophic flow, *Science Asia*, **32**: 1-10.
- Bartley ML, Boeing WJ, Corcoran AA, Holguin FO. & Schaub T., 2013.** Effects of salinity on growth and lipid accumulation of biofuel microalga *Nannochloropsis salina* and invading organisms. *Biomass Bioenerg*, **54** : 83-88.
- Bassompierre C., 2007.** Procédé à boues activées pour le traitement d'effluents papetiers : de la conception d'un pilote à la validation de modèles. Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique de Grenoble, France.
- Bastin G., Dochain D., 1990.** On-line Estimation and adaptive control of bioreactors, *Elsevier*.
- Becerra Celis G. P., 2009.** Proposition de stratégies de commande pour la culture de microalgues dans un photobioréacteur continu. Thèse de Doctorat, Ecole supérieure d'électricité, Gif-sur-Yvette (France).
- Becker E.W., 1994.** Microalgae Biotechnology and Microbiology. *Cambridge University Press, Cambridge*, p 304.
- Beer L.L., Boyd E.S., Peters J.W., Posewitz M.C., 2009.** Engineering algae for biohydrogen and biofuel production, *Current Opinion in Biotechnology*, **20**: 264-271.

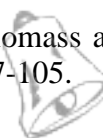
- Belkoura M., Benider A. & Dauta A., 1997.** Influence de la température, de l'intensité lumineuse et du stade de croissance sur la composition biochimique de *Chlorellasorokiniana*. *Annls Limnol*, **33** (1) : 3-11.
- Benzidane D., 2011.** Effet d'une supplémentation de l'aliment avec de l'antioxydant (vitamines E et C) sur le stress oxydatif chez le tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*). Oran, Université Oran1 - Ahmed Ben Bella
- Bermejo Román R., Álvarez-Pez J.M., Acién Fernández F.G., Molina Grima E., 2002.** Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. *Journal of Biotechnology*, **93**: 73-85.
- Bigogno C., Khozin-Goldberg I., Boussiba S., Vonshk A., Cohen Z., 2002.** Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. *Phytochemistry* **60**: 497-503.
- Bilanovic D., Andargatchew A., Kroeger T., Shelef G., 2009.** Freshwater and marine microalgae sequestering of CO₂ at different C and N concentrations – response surface methodology analysis. *Energy Conversion and Management*, **50**:262-267.
- Bitog J., Lee I.B., Lee C.G., Kim K.S., Hwang H.S., Hong S.W., Seo I.H., Kwon K.S., Mostafa E., 2011.** Application of computational fluid dynamics for modeling and designing photobioreactors for microalgae production. *Computers and Electronics in Agriculture*, **72**:131-147.
- Bligh E.G., & Dyer W.J., 1959.** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, **37**(8) : 911-917.
- Boileau M.E., 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 3^{ème} génération. *Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître en environnement (M. env.)*. Université de Sherbrooke, P 16.
- Bonnefond H., 2015.** Amélioration de microalgues à vocation énergétique par pression de sélection continue. PhD thesis, Université Pierre et Marie Curie, p12.
- Borowitzka M.A., 1999.** Commercial production of microalgae: Ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of biotechnology*, **70**: 313-321.
- Bougaran G., Bernard O., Sciandra A., 2010.** Modeling continuous cultures of microalgae colimited by nitrogen and phosphorus. *Journal of Theoretical Biology*, **265** (3): 443-454.
- Bouchoucha T., Ahmed M.F., Al-Naffouri T.Y., Alouini M.S., 2015.** Distributed estimation based on observations prediction in wireless sensor networks, *IEEE Signal Processing Letters*, **22**:1530-1533.
- Bradford M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem*, **72**: 248-254.
- Brennan L. & Owende P., 2010.** Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14**: 557-577.
- Brown M.R., Jeffrey S.W., Volkman J.K., Dunstan G.A., 1994.** Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, **151**: 315-331.

- Bumbak F., Cook S., Zachleder V., Hauser S., Kovar K., 2011.** Best practices in heterotrophic highcell-density microalgal processes: achievements, potential and possible limitations. *Applied microbiology and biotechnology*, **91(1)** : 31-46.
- Cadoret J., Bernard O., 2008.** La production de biocarburant lipidique avec des microalgues : promesses et défis. *Journal de la Société de Biologie*, **202** : 201-211.
- Cadoret J.P., Bardor M., Lerouge P., Cabiglieria M., Henriquez V., Carlier A., 2008.** Les microalgues Usines cellulaires productrices de molécules commerciales recombinantes. *Med Sci* ; **24** : 375-382.
- Cai T., Park S.Y., Li Y., 2013.** Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renew and SustEner Rev*, **19**: 360-369.
- Camacho Rubio F., Acien Fernandez F.G., Sanchez Perez J.A., Garcia Camacho F., Molina Grima E., 1999.** Prediction of dissolved oxygen and carbon dioxide concentration profiles in tubular photobioreactors for microalgal culture. *Biotechnol. Bioeng.* **62** : 71-86.
- Cantin I., 2010.** La production de biodiesel à partir des microalgues ayant un métabolisme hétérotrophe. Maîtrise en environnement (M. Env), Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, pp. 1-82.
- Carballo-Cárdenas E.C., Tuan P.M., Janssen M., Wijffels R.H., 2003.** Vitamin E (α tocopherol) production by the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. *Biomolecular Engineering*, **20**: 139-147.
- Carlsson A.S., van Beilen J.B., Möller R., Clayton D., 2007.** Micro-and macro-algae: utility for industrial applications. *UK: CPL Press*, pp.82.
- Carmelo R.T., 1997.** Identifying marine phytoplankton. Florida Department of Environmental Protection Florida Marine Research institute St. Petersburg, Florida Academic press an imprint of Elsevier.
- Chapman J.B., Johnson E.A., Kootsey J.M., 1983.** Electrical and biochemical properties of an enzyme model of the sodium pump, *J Membr Biol*, **74**: 139-153.
- Charlotte C., 2016.** Effets quantitatifs et qualitatifs de la lumière sur la croissance des microalgues en culture dense et sur leur production de molécules d'intérêt : vers l'optimisation des procédés de production de microalgues. Océanographie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI.
- Chen C., Yeh K., Aisyah R., Lee D. & Chang J., 2011.** Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel productio. *Bioresource technology*, **102**: 71-81.
- Chen CY., Zhao XQ., Yen HW., Ho SH., Cheng CL., Lee DJ., Bai FW., Chang JS., 2013.** Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochemical Engineering Journal* **78**: 1-10.
- Chen H., Jiang J.G., 2009.** Osmotic responses of *Dunaliella* to the changes of salinity. *J. Cell. Physiol*, **219**: 251-258.
- Chen WH., Chen SY., Chao SJ., Jian ZC., 2011.** Butanol production from the effluent of hydrogen fermentation. *Water Sci Technol.* **63(6)**:1236-1240.
- Chisti Y., 2008.** Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol*, **26**: 126-131.
- Chisti, Y., 2007.** Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, **25**: 294-306.

- Chisti Y., Moo-Young M., 1996.** Split-cylinder airlift reactors- hydraulics and hydrodynamics of a new mode of operation. *Chem. Eng. Commun*, pp19-44.
- Christenson L., Sims R., 2011.** Production and harvesting of microalgae for wastewatertreatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology Advances*, **29**: 686-702.
- Chynoweth D.P., 2002.** Review of biomethane from marine biomass. University of Florida.
- Claquin P., Probert I., Lefebvre S.&Veron B., 2008.** Effects of temperature on photosynthetic parameters and TEP production in eight species of marine microalgae. *Aquatic Microbial Ecology*. pp. 511-11.
- Campos H., Boeing WJ., Dungan BN. & Schaub T., 2014.** Cultivating the marine microalga *Nannochloropsis salina* under various nitrogen sources: effect on biovolume yields, lipid content and composition, and invasive organisms. *Biomass Bioenergy* 66, 301-307.
- Converti A., Casazza A.A., Ortiz E.Y., Perego P. & Borghi M.D., 2009.** Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, **48**: 1146-1151.
- Contreras A., Garcia F, Molina E, Merchuk J.C., 1998.** Interaction Between CO-Mass Transfer, Light Availability, and Hydrodynamic Stress in the Growth of *Phaeodactylum tricorutum* in a Concentric Tube Airlift Photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng*, **60** : 318-325.
- Couté A., 1995.** Diversité chez les microalgues. *Techniques sciences Méthodes Génie Urbain Rural*, **1** : 20-24.
- Coutteau P., Geurden I., Camara M.R., Bergot P., Sorgeloos P., 1997.** Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture. *Aquaculture*, **155**: 149-164.
- Croft M.T., Warren M.J., Smith A.G., 2006.** Algae Need Their Vitamins. *Eukaryot. Cell*, **5**: 1175-1183.
- Cuaresma M., Garbayo I., Vega J.M., Vilchez C., 2006.** Growth and photosynthetic utilization of inorganic carbon of the microalga *Chlamydomonas acidophila* isolated from Tinto river. *Enzyme and Microbial Technology*, **40** : 158-162.
- Daoud D., 2013.** Photobioréacteurs pour la culture de microalgues : Caractéristiques et paramètres de culture Attaché de recherche. *Equipe : biomasse et technologie de l'hydrogène*, 1-29.
- Da Silva A.F., Lourenço S.O., Chaloub R.M., 2009.** Effects of nitrogen starvation on the photosynthetic physiology of a tropical marine microalga *Rhodomonas sp.* (Cryptophyceae), *Aquatic Botany*, **91(4)**: 291-297.
- Dayanda C., Sarada R., Bhattacharya S. & Ravishankar G.A., 2005.** Effect of media and culture conditions on growth and hydrocarbon production by *Botryococcus braunii*. *Process Biochemistry*, **40(9)**: 3125-3131.
- De la Noüe J., De Pauw N., 1988.** The potential of microalgal biotechnology: a review of production and uses of microalgae. *Biotechnology Advances*, **6**: 723-770.
- Degen J., Uebele A., Retze A., Schmid-Staiger U. & Trösch W., 2001.** A novel airlift photobioreactor with baffles for improved light utilization through the flashing light effect. *Journal of Biotechnology*, **92**: 89-94.

- Del Campo J.A., Moreno J., Rodríguez H., Vargas M.A., Rivas J., Guerrero M.G., 2000.** Carotenoid and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water Research*, **36**: 2941-2948.
- Demirbas A., 2006.** Oily products from mosses and algae via pyrolysis. *Energy Sources Part A-Recovery Utilization and Environmental Effects*, **28**: 933-940.
- Doré-Deschênes F., 2009.** Utilisation des microalgues comme source d'énergie durable. Essai de maîtrise en environnement, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, p111.
- Doucha J., Straka F., Livansky K., 2005.** Utilization of flue gas for cultivation of microalgae (*Chlorella sp.*) in an outdoor open thinlayerphotobioreactor. *J ApplPhycol*, **17** : 403-412.
- Dragone G, Fernandes BD, Abreu AP, Vicente AA, Teixeira JA., 2011.** Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. *ApplEnerg*, **88(10)**: 3331-3335.
- Droop M.R., 2007.** Vitamins, phytoplankton and bacteria: symbiosis or scavenging. *Journal of Plankton Research*, **29(2)** : 107-113.
- Druart J.C. & Rimet F., 2008.** Protocoles d'analyse du phytoplancton de l'INRA : prélèvement, dénombrement et biovolumes. *INRA Thonon*, pp 96.
- Dubinsky Z. & Schofield O., 2010.** From the light to the darkness: thriving at the light extremes in the oceans. *Hydrobiologia*, **639**: 153-171.
- Dubois M., Gilles KA., Hamilton JK., Rebers PA. & Smith F., 1956.** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*, **28**: 350-356.
- Eggert A., Nitschke U., West J.A., Michalik D., Karsten U., 2007.** Acclimation of the intertidal red alga *Bangiopsis subsimplex* (Stylonematophyceae) to salinity changes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **343**: 176-186.
- Engel D., Aribat S., Balzergue S., 2010.** Looking for sunflower (*Helianthus annuus*) genes involved in response to drought stress: what we can learn from expression data in using the 26 million-feature Affymetrix. SUNBIO conference, Antalya, Turquie.
- Estevez M. S., Malanga G., Puntarulo S., 2001.** Iron-dependent oxidative stress in *Chlorella vulgaris*. *Plant Science*. **161**: 9-17.
- Fabregas J., Maseda A., Dominguez A., Ferreira M., Otero A., 2002.** Changes in the cell composition of the marine microalga, *Nannochloropsis gaditana*, during a light: dark cycle. *BiotechnolLett*, **24**: 1699-1703.
- Fabregas J., Maseda A., Dominguez A., Otero A., 2004.** The cell composition of *Nannochloropsis sp* changes under different irradiances in semicontinuous culture. *World J. Microbiol. Biotechnol*, **20**: 31-35.
- Falkowski P.G., Raven J.A., 2007.** Aquatic photosynthesis. 2nd ed. Princeton (NJ): Princeton University Press.
- Fan J., Yan C., Andre C., Shanklin J., Schwender J. & Xu C., 2012.** Oil accumulation is controlled by carbon precursor supply for fatty acid synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol*, **53**: 1380-1390.
- FAO., 2010.** Algae-based biofuel: applications and coproduction, *FAO aquatic biofuels working group*, p44.

- FAO., 1996.** The state of food and agriculture. *FAO Agriculture series*, p29.
- Fatima M., Mandiki S.N.M., Douxfils J., Silvestre F., Coppe P., Kestemont P., 2007.** Combined effects of herbicides on biomarkers reflecting immune-endocrine interactions in goldfish immune and antioxidant effects, *Aquatic Toxicology* **81**: 159-167.
- Fidalgo J. P., Cid A., Torres E., Sukenik A. & Herrero C., 1998.** Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. *Aquacul*, **166** : 105-116.
- Filali R., 2012.** Estimation et commande robustes de culture de microalgues pour la valorisation biologique de CO₂. *Ecole Doctorale « Sciences et Technologies de l'Information des Télécommunications et des Systèmes »*, p180.
- Fogg G.E., 1953.** The metabolism of algae, freshwater microalga *Scenedesmus sp.* under different cultivation temperature. *Bioresource Technology*, **102** (3): 3098-3102.
- Fawley K.P., Fawley M.W., 2007.** Observations on the Diversity and Ecology of Freshwater *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae), with Descriptions of New Taxa. *Protist*, **158**: 325-336.
- Gavrilescu M., Chisti Y., 2005.** Biotechnology a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnology Advances*, **23**: 471-99.
- Gerloff-Elias A., Spijkerman E. & Pröschold T., 2005.** Effect of external pH on the growth, photosynthesis and photosynthetic electron transport of *Chlamydomonas acidophila*, isolated from an extremely acidic lake (pH 2.6). *Plant, Cell and Environment*, **28**: 1218-1229.
- Ghirardi M.L., Dubini A., Yu J.P., Maness P.C., 2009.** Photobiological hydrogenproducing systems. *Chemical Society Reviews*, **38**: 52-61.
- Glass W.S., Anbar., 2009.** Coevolution of metal availability and nitrogen assimilation in cyanobacteria and algae. *Geobiology*. Arizona State University, USA.
- Global Warming., 2010.** Union of Concerned Scientist.
- Goldman JC. & Brewer PG., 1980.** Effect of nitrogen source and growth rate on phytoplankton-mediated changes in alkalinity. *Limnol Oceanogr*, **25**: 352-357.
- Gordon R., Seckbach J., 2012.** The Science of Algal Fuels: *Phycology, Geology, Biophotonics Genomics and Nanotechnology Springer*. **25**: 506.
- Gouveia L., Oliveira A.C., 2009.** Microalgae as a raw material for biofuels production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 269-274.
- Gouveia L., Nobre B.P., Marcelo F.M., Mrejen S., Cardoso M.T., Palavra A.F., Mendes R.L., 2007.** Functional food oil coloured by pigments extracted from microalgae with supercritical CO₂. *Food Chemistry*, **101**: 717-723.
- Granum E., Kirkvold S. & Myklestad S. M., 2002.** Cellular and extracellular production of carbohydrates and amino acids by the marine diatom *Skeletonema costatum*: diel variations and effects of N depletion. *Mar. Ecol. Prog. Ser*, **242**: 83-94.
- Grobbelaar J. U. & Kurano N., 2003.** Use of photoacclimation in the design of a novel photobioreactor to achieve high yields in algal mass cultivation. *Journal of Applied Phycology*, **15**: 121-126.
- Gu, N., Q. Lin. & G. Qin., 2012.** Effect of salinity change on biomass and biochemical composition of *Nannochloropsis oculata*. *J. World Aquacult*, **43**: 97-105.



- Guan Y., Zhang W., Deng M., Jin M., Yu X., 2004.** Significant enhancement of photobiological H₂ evolution by carbonylcyanide mchlorophenylhydra zone in the marine green alga *Platymonas subcordiformis*. *Biotechnology Letters*, **26**: 1031-1035.
- Guaratini T., Cardozo K.H.M., Pinto E., Colepicolo P., 2009.** Comparison of diode array and electrochemical detection in the C30 reverse phase HPLC analysis of algae carotenoids. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **20**: 1609-1616.
- Guidi L., 2016.** Plankton networks driving carbon export in the oligotrophic ocean. *Nature*, **532**: 465-470.
- Guschina I.A. & J.L. Harwood., 2006.** Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog. Lipid Res*, **45**: 160-186.
- Gustafson K.R., Cardellina J.H., Fuller R.W., Weislow O.S., Kiser R.F., Snader K.M., Patterson K.M.L., Boyd M.R., 1989.** AIDS-antiviral sulfolipids from cyanobacteria (blue green algae). *Journal of the National Cancer Institute*. **81** : 1254-1258.
- Gutierrez R., Gutierrez-Sanchez R., Nafidi A., 2008.** Trend analysis using non homogeneous stochastic diffusion processes. Emission of CO₂; Kyoto protocol in Spain. *Stochastic Environmental Research and Risk Assessment*, **22**: 57-66.
- Hankammer B., Lehr F., Rupprecht J., Mussnug J.H., Posten C., Kruse O., 2007.** Photosynthetic biomass and H₂ production by green algae: from bioengineering to bioreactor scale up. *Physiologia Plantarum in press*. **131(1)**:10-21.
- Harun R., Singh M., Forde G.M., Danquah M.K., 2010.** Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **14**: 1037-1047.
- Harun R., Yip J.W., Thiruvankadam S., Ghani W.A., Cherrington T., Danquah M.K., 2014.** Algal biomass conversion to bioethanol-a step-by-step assessment. *Biotechnol. J*, **9**: 73-86.
- Hibberd D.J., 1981.** Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (synonym Xanthophyceae). *Bot J Linn Soc*, **82**: 93-119.
- Ho S.H., Chen C.Y., Chang J.S., 2012.** Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technology*, **113**: 244-252.
- Ho S.H., Chen W.M., Chang J.S., 2010.** *Scenedesmus obliquus* CNW-N as a potential candidate for CO₂ mitigation and biodiesel production. *Bioresour Technol*, **101**: 8725-8730.
- Hodaifa G., Martinez M. E. & Sanchez S., 2009.** Daily doses of light in relation to the growth of *Scenedesmus obliquus* in diluted three-phase olive mill wastewater. *J. Chem. Technol Biotechnol*, **84**: 1550-1555.
- Höök M. & Tang Xu., 2013.** Depletion of fossil fuels and anthropogenic climate change. *Journal of Energy Policy*, **52**: 797-809.
- Hoppe H.A., 1979.** Marine algae and their products and constituents in pharmacy. *Marine Algae in Pharmaceutical Science*, pp 25-119.
- Hu D., Liu H., Yang C., Hu E., 2008.** The design and optimization for light-algae bioreactor controller based on Artificial Neural Network-Model Predictive Control. *Acta Astronautica*, **63**: 1067-1075.

- Hu Q., 2004.** Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products - Species of high potential: *Arthrospira platensis*. In: Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology, Richmond A. (ed.), Blackwell Publishing Ltd., Oxford. pp. 264-272.
- Hu Y.F., 1998.** Role of PHO85 gene in the cell cycle control of budding yeast. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao*, **31**: 265-71.
- Hua C.W., Chuang L.T., Yu P.C, Chen C.N.N. 2013.** Pigment production by a new thermotolerant microalga *Coelastrrella sp.* F50. *Food Chemistry*, **138**: 2071-2078.
- Huang GH., Chen F., Wei D., Zhang XW., Chen G., 2010.** Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Appl. Energy*, **87**: 38-46.
- Huang TY., Lu WC. & Chu IM., 2012.** A fermentation strategy for producing docosahexaenoic acid in *Aurantiochytrium limacinum* SR21 and increasing C22:6 proportions in total fatty acid. *BioresourTechnol*, **123**: 8-14.
- Israelsson, P.H., Chow, A.C., Adams, E.E., 2009.** An updated assessment of the acute impacts of ocean carbon sequestration by direct injection. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, **4**: 262-271.
- Jiang Y., Chen F., Liang S.Z., 1999.** Production potential of docosahexaenoic acid by the heterotrophic marine dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii*. *Process Biochemistry*, **34**: 633-637.
- Juneja A., Ruben Michael Ceballos R.M., Mur G.S., 2013.** Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production. *Energies*, **6**: 4607-4630.
- Jupin H., Lamant A., 1999.** La Photosynthèse. *Dunod- collection Sciences sup 2e cycle*, Paris, 268 p.
- Katijah M., Haryati J., Nor Azimah M.Z., 2015.** The effect of different phosphate concentration on growth, lipid productivity and methyl palmitate methyl ester production by *Nannochloropsis oculata*. *Jurnal Teknologi*, **77**: 79-83.
- Kang C. D., Lee J. S., Park T. H., Sim S. J., 2007.** Complementary limiting factors of astaxanthin synthesis during photoautotrophic induction of *Haematococcus pluvialis*: C/N ratio and light intensity. *Appl Microbiol Biotechnol*. **74**: 987-994.
- Khotimchenko S.V., Yakovleva I.M., 2005.** Lipid composition of the red alga *Tichocarpus crinitus* exposed to different levels of photon irradiance. *Phytochemistry*, **66**: 73-79.
- Klein B.C., Walter C., Lange H.A., Buchholz R., 2012.** Microalgae as natural sources for antioxidative compounds. *J Appl Phycol*, **24**: 1133- 1142.
- Kondili E.M., Kaldellis J.K., 2007.** Biofuel implementation in East Europe: current status and future prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **11**: 2137-2151.
- Kozłowska-Szerenos B., Bialuk I., Maleszewski S., 2004.** Enhancement of photosynthetic O_2 evolution in *Chlorella vulgaris* under high light and increased CO_2 concentration as a sign of acclimation to phosphate deficiency. *Plant Physiol Biochem*, **42**: 403-409.
- Kroth P.G., Chiovitti A., Gruber A., Martin-Jezequel V., Mock T., Parker M.S., Stanley, M.S., Kaplan A., Caron L., Weber T., Maheswari U., Armbrust E.V., Bowler C., 2008.** A Model for Carbohydrate Metabolism in the Diatom *Phaeodactylum tricornutum* Deduced from Comparative Whole Genome Analysis. *PLoS ONE*, p1426.

- Krzemińska I., Pawlik-Skowrońska B., Trzcińska M., Tys J., 2014.** Influence of photoperiods on the growth rate and biomass productivity of green microalgae. *Bioprocess Biosyst. Eng*, **37**: 735-741.
- Kumar M., Ou Y.L., Lin J.G., 2010.** Co-composting of green waste and food waste at low C/N ratio. *Waste Manage*, **30** : 602-609.
- La Fontaine S., Quinn J. M., Nakamoto S. S., Page M. D., Göhre V., Moseley J. L., Kropat J., Merchant S., 2002.** Copper-dependent iron assimilation pathway in the model photosynthetic eukaryote *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic cell*, **5**: 736-757.
- Langley N., Harrison S. & van Hille R., 2012.** A critical evaluation of CO₂ supplementation to algal systems by direct injection. *Biochemical Engineering Journal*, **68**: 70-75.
- Lavin P.L., Lourenco S.O., 2005.** An evaluation of the accumulation of intracellular inorganic nitrogen pools by marine microalgae in cultures. *Brazilian Journal of Oceanography*, **53** : 55-67.
- Lazard J., 2007.** Aquaculture et espèces introduites : exemple de la domestication ex situ des tilapias. *Cahiers Agricultures*, **16 (2)** : 123-124.
- Lee J.K., Brandin E., Branton D., Goldstein L.S. (1997).** Alpha-Spectrin is required for ovarian follicle monolayer integrity in *Drosophila melanogaster*. *Development*, **124(2)**: 353-362.
- Leite C.R., Bicudo C.E.M., 1977.** *Tetranephris*, a new genus of Chlorococcales (*Chlorophyceae*) from southern Brazil. *Phycologia*, **16**: 231-233.
- Lechevalier H. A., 1977.** Volume II Fungi, Algae, Protozoa, and Viruses. 2ème édition, Floride, Laskin, Allen I., CRC handbook of microbiology, p 874.
- Lefranc M., Thénot A., Lepère C., Debros D., 2005.** Genetic diversity of small eukaryotes in lakes differing by their trophic status. *Appl. Environ. Microbiol*, **71** : 5935-5942.
- Levine R.B., Costanza-Robinson M.S., Spatafora G.A., 2011.** *Neochloris oleoabundans* grown on anaerobically digested dairy manure for concomitant nutrient removal and biodiesel feedstock production, *Biomass and Bioenergy*, **35(1)**: 40-49.
- Lewin J. C., 1966.** Silicon metabolism in diatoms. V. *Germanium* dioxide, a specific inhibitor of diatom growth, *Phycologia*, **6**:1-12.
- Li H.B., Cheng K.W., Wong C.C., Fan K.W., Chen F., Jiang Y., 2006.** Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*. **102**: 771-776.
- Li Y., Han D., Sommerfeld M., Hu Q., 2011.** Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococcum* sp. (Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions. *Bioresource Technology*. **102**: 123-129.
- Liang XA., Dong WB., Miao XJ., Dai CJ., 2006.** Production technology and influencing factors of microorganism grease. *Food Res Dev*, **27(3)**: 46-47.
- Lichtenthaler H.K., 1987.** Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol*, **148**: 350-382.
- Liu Y., 2007.** Effects of randomizing the Sup35NM prion domain sequence on formation of amyloid fibrils in vitro. *BiochemBiophys Res Commun*, **353(1)**:139-46.

- Lorenz R. T., Cysewski G. R., 2000.** Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends biotechnology*, **18**: 160-167.
- Lorne D., 2011.** Des Biocarburants à partir des micro-algues. *IFP Energies nouvelles*.
- Luan T.G., Jing J., Sidney M.N., Chang Y.S., Nora F.Y., 2006.** Biosorption and biodegradation of tributyltin (TBT) by alginate immobilized *Chlorella vulgaris* beads in several treatment cycles. *Process Biochemistry*, **41**: 1560-1565.
- Lu CM., Torzillo G., Vonshak A., 1999.** Kinetic response of photosystem II photochemistry in cyanobacterium *Spirulina platensis* to high salinity is characterized by two distinct phases. *Aust J Plant Physiol*, **26**: 283-292.
- Lu W.J., Hwang S.J., Chang C.M., 1995.** Liquid velocity and gas holdup in three-phase internal loop airlift reactors with low-density particles. *Chemical Engineering Science*, **50** : 1301-1310.
- Lucchetti A., 2015.** Modélisation et conception d'un système de culture de microalgues Génie des procédés. *Ecole Nationale Supérieure des Mines de Paris*, pp. 17.
- Mahat K., Jamaluddin H., Mohd Zain N. A., 2015.** The effect of different phosphate concentration on growth, lipid productivity and methyl palmitate methyl ester production by *Nannochloropsis oculata*. *Journal Teknologi*. **77**: 79-83.
- Mallick N., Mohn F.H., 2000.** Reactive oxygen species: response of algal cells. *Journal of Plant Physiology*. **157**: 183-193.
- Mandal S., Mallick N., 2009.** Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, **84** : 281-291.
- Massart A., 2010.** Étude de stratégies de culture de *Dunaliella tertiolecta* combinant haute densité cellulaire et accumulation de lipides en vue de produire du biodiesel. *Université de Mons (UMONS). Faculté polytechnique. Service de Chimie et Biochimie appliquées*.
- Mata T.M., Martins AA., Ceatano NS., 2010.** Microalgae for biodiesel production and other applications. *Sustain. Energy Rev*, **14** : 217-232.
- Morot-Gaudry J.F., 1997.** Le double jeu de la Rubisco. *Biofutur*, pp 28-30.
- Mayer A.M.S., Hamann M.T., 2004.** Marine pharmacology in 2000: marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune, and nervous system and other miscellaneous mechanisms of action. *Marine Biotechnology*, **6**: 37-52.
- Meeting F.B., 1996.** Biodiversity and application of microalgae. *Journal of industrial Microbiology*, **17**: 477-489.
- Melis A., Happe T., 2006.** Trails of green alga hydrogen research from Hans Gaffron to new frontiers. In: Discoveries in Photosynthesis, *Springer Netherlands* (ed.), pp. 681-689.
- Meseck S.L., Alix J.H. & Wikfors G.H., 2005.** Photoperiod and light intensity effects on growth and utilization of nutrients by the aquaculture feed microalga, *Tetraselmis chui* (PLY429). *Aquaculture*, **246**: 393-404.
- Miao X., Wu Q., 2004.** High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. *Journal of Biotechnology*, **110**: 85-93.

- Michel K.P., Pistorius E. K., 2004.** Adaptation of the photosynthetic electron transport chain in cyanobacteria to iron deficiency: The function of IdiA and IsiA. *Physiologia Plantarum*, **120**: 36-50.
- Mihova S.G., Georgiev D.I., Minkov K.M., 1996.** Phycobiliproteins in *Rhodella reticulata* and photoregulatory effects on their content. *Journal of Biotechnology*, **48(3)**: 251-257.
- Miron A.S., Gomez A.C., Camacho F.G., Grima E.M., Chisti Y., 1999.** Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae. *Journal of Biotechnology*, **70**: 249-270.
- Miron T., Rabinkov A., Mirelman D., Wilchek M., Weiner L., 2000.** The mode of action of allicin: its ready permeability through phospholipid membranes may contribute to its biological activity. *Biochimica & Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **1463(1)**: 20-30.
- Mohanadoss P., Mohd Fadil D., 2013.** Effect of Light/Dark cycle on Biomass and Lipid Productivity by *Chlorella pyrenoidosa* using Palm Oil Mill Effluent (POME). *Journal of Scientific & Industrial Research*, **72**: 703-706.
- Monteiro C.M., Castro P.M.L., Malcata F.X., 2012.** Metal uptake by microalgae: underlying mechanisms and practical applications. *Biotechnology progress*, **28(2)**: 299-311.
- Moreau D., Tomasoni C., Jacquot C., Kaas R., Le Guedes R., Cadoret J.P., Muller-Feuga A., Kontiza I., Vagias C., Roussis V., Roussakis C., 2006.** Cultivated microalgae and the carotenoid fucoxanthin from *Odontella aurita* as potent antiproliferative agents in bronchopulmonary and epithelial cell lines. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **22**: 97-103.
- Morita M., Watanabe Y., Saiki H., 2000.** Investigation of photobioreactor design forenhancing the photosynthetic productivity of microalgae. *Biotechnology and Bioengineering*, **69**: 693-698.
- Moseley J.L., Chang C.W., Grossman A.R., 2006.** Genome-based approaches to understanding phosphorus deprivation responses and PSR1 control in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*, **5**: 26-444.
- Mulbry W., Kondrad S., Pizarro C., Kebede-Westhead E., 2008.** Treatment of dairy manure effluent using freshwater algae: algal productivity and recovery of manure nutrients using pilot-scale algal turf scrubbers. *Bioresource technology*, **99(17)**: 8137-42.
- Muller-Feuga A., Kontiza I., Vagias C., Roussis V., Roussakis C., 2006.** Cultivated microalgae and the carotenoid fucoxanthin from *Odontella aurita* as potent antiproliferative agents in bronchopulmonary and epithelial cell lines. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **22**: 97-103.
- Muñoz R., Guieysse B., 2006.** Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. *Water Research*, **40**: 2799-2815.
- Olaizola M., 2003.** Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering*, **20**:459-466.
- Osinga R., Tramper J., Burgess J.G., Wijffels R. H., 1999.** Marine bioprocess engineering. *Proceedings of the Society for Industrial Microbiology*. pp 351-413.
- Pal D., Khozin-Goldberg I., Cohen Z., Boussiba S., 2011.** The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis sp.* *Appl. Microbiol. Biotechnol*, **90**: 1429-1441.

- Pancha I., Chokshi K., Mishra S., 2015.** Enhanced biofuel production potential with nutritional stress amelioration through optimization of carbon source and light intensity in *Scenedesmus sp.* CCNM 1077. *BioresourTechnol*, **179** : 565-572.
- Paoli J., 2014.** Nouvelle imagerie pédagogique de l'invisible. *Faculté de médecine Nancy*, 73-79.
- Peers G., Truong T. B., Ostendorf E., Busch A., Elrad D., Grossman A. R., Hippler M., Niyogi K. K., 2009.** An ancient light-harvesting protein is critical for the regulation of algal photosynthesis. *Nature*, p 462.
- Park J.B.K., Craggs R.J. & Shilton A.N., 2011.** Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresour. Technol*, **102**: 35-42.
- Patterson G.M.L., Baldwin C.L., Bolis C.M., Caplan F.R., Karuso H., Larsen L.K., Levine I.A., Moore R.E., Nelson C.S., Tschappat K.D., Tuang G.D., Furusawa E., Furusawa S., Norton T.R., Raybourne R.B., 1991.** Antineoplastic activity of cultured blue green algae (Cyanophyta). *Journal of Phycology*. **27**: 530-536.
- Lamers P., Hoefnagels R., Junginger M., Hamelinck C., Faaij A., 2013.** Global solid biomass trade for energy by 2020: an assessment of potential import streams and supply costs to North-West Europe under different sustainability constraints, **7**: 618-634.
- Peng K.T., Zheng C.N., Xue J., Chen X.Y., Yang W.D., Liu J.S., 2014.** Delta 5 fatty acid desaturase upregulates the synthesis of polyunsaturated fatty acids in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *J. Agric. Food Chem*, **62**: 8773-8776.
- Perez-Garcia O., Escalante F.M.E., de-Bashan L.E., Bashan Y., 2011.** Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, **45**: 11-36.
- Persic, V., Horvatic, J., Has-Schon, E., Bogut, I., 2009.** Changes in n and p limitation induced by water level fluctuations in Nature Park Kopacki Rit (Croatia): nutrient enrichment bioassay. *Aquatic Ecology*, **43 (1)**: 27-36
- Person J., Mathieu D., Sassi J.F., Lecurieux-Belfond L., Gandolfo R., Boyen C., Lépine O., Pruvost J., Potin P., Deslandes E., Chagvardieff P., Findeling A., Legrand J., Cadoret J.P., Bernard O., 2011.** Algues, filières du futur. (*Livre turquoise*), Romainville : AdebioTech. Ed. AdebioTech.
- Pignolet O., Jubeau S., Vaca-Garcia C., Michaud P., 2013.** Highly valuable microalgae: biochemical and topological aspects. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **40(8)**: 781-96.
- Phillips T.R., Maluendes S., Green S., 1995.** Collision dynamics for an asymmetric top rotor and a linear rotor: Coupled channel formalism and application to H₂O-H₂. *J. Chem. Phys*, **102**: 6024-6031.
- Piorreck M., Baasch K., Pohl P., 1984.** Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater Green and Blue Green Algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry*, **23(2)**: 207-2164.
- Pribyl P., Cepak V., Zachleder V., 2012.** Production of lipids in 10 strains of *Chlorella* and *Parachlorella*, and enhanced lipid productivity in *Chlorella vulgaris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **94**: 549-561.
- Pulz O., Gross W., 2004.** Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **65**: 635-648.

- Pulz O., 2001.** Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, **57(3)** : 287-293.
- Mocquet C., 2009.** Interférence entre les processus mitotiques et la prise d'azote chez *Thalassiosira weissflogii*. Implications en modélisation et sur les flux globaux Océan, Atmosphère. *Université Pierre et Marie Curie*. Pp109.
- Rao A.R., Dayananda C., Sarada R., Shamala T.R., Ravishankar G.A., 2007.** Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresour. Technol*, **98**: 560-564.
- Rasoul-Amini S., Montazeri-Najafabady N., Mobasher M.A., Hoseini-Alhashemi S., Ghasemi Y., 2011.** *Chlorella sp.*: A new strain with highly saturated fatty acids for biodiesel production in bubble-column photobioreactor, *Applied Energy*, **88**: 3354-3356.
- Rastoin J.L., 2016.** L'innovation au service d'un développement rural durable et d'un équilibre des territoires. *Ipemed*, 1-6.
- Raven J. A. 1984.** Energetics and transport in aquatic plants. *A.R. Liss edition New York*, p 587.
- Rawat I., Ranjith Kumar R., Mutanda T., Bux F., 2011.** Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, **88**: 3411-3424.
- Razzak S.A., Hossain M.M., Lucky R.A., Bassi A.S., 2013.** Integrated CO₂ Capture, Wastewater Treatment and Biofuel Production by Microalgae Culturing-A Review. *Renewable Sustainable Energy Rev.* **27**: 622-653.
- Reboloso Fuentes M.M., AcienFernández G.G., Sánchez Pérez J.A., Guil Guerrero J.L., 2000.** Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. *Food Chemistry*, **70(3)**: 345-353.
- Redfield A. C., 1934.** On the proportions of organic derivations in sea water and their relation to the composition of plankton. *James Johnstone Memorial*, pp177-192.
- Richmond A., 2008.** Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. *John Wiley & Sons*.
- Richmond A., 2004.** Biological principles of mass cultivation. Handbook of Microalgal Culture. *Biotechnology and Applied Phycology*, p566.
- Riebesell U., Schulz K.G., Bellerby R.G.J., Botros M., Fritsche P., Meyerhofer M., Neill C., Nondal G., Oschlies A., Wohlers J., Zollner E., 2007.** Enhanced biological carbon consumption in a high CO₂ ocean. *Nature*, **450**: 545-548.
- Ritchie R.J., 2006.** Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynth. Res*, **89** : 27-41.
- Riyahi J., Haouazine Y., Akallal R., Mouradi A., Creach A., Givernaud T., Mouradi A., 2007.** Influence des nitrates, de la salinité et du stress lumineux sur la teneur en acides gras et en -carotène de *Dunaliella salina*. *Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux*. **146** : 235-250.
- Rochaix J. D., 2001.** Assembly, function, and dynamics of the photosynthetic machinery in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant physiology*, **127 (4)**: 1394-1398.

- Rodolfi L., ChiniZittelli G., Bassi N., Padovani G., Biondi N., Bonini G., Tredici M.R., 2009.** Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng*, **102**: 100-112.
- Roopnarain A., Sym S.D. & Gray V. M., 2015.** Time of culture harvest affects lipid productivity of nitrogen-starved *Isochrysisgalbana* U4 (Isochrysidales, Haptophyta). *Aquaculture*, **438**: 12-16.
- Ruangsomboon S., 2015.** Effects of different media and nitrogen sources and levels on growth and lipid of green microalga *Botryococcusbraunii* and its biodiesel properties based on fatty acid composition. *Bioresource Technology*, **191**: 377-384.
- Rubio F. C., Garcia J. L., Molina E., Chisti Y., 1999.** Steady-state axial profiles of dissolved oxygen in tall bubble column bioreactors. *Chemical Engineering Science*, **54**: 1711-1723.
- Sadi M., 2012.** Les microalgues : un défi prometteur pour des biocarburants propres. *Le 2ème Séminaire International sur les Energies Nouvelles et Renouvelables*.
- Sakjanes K., 2011.** Use of algae technology for production of biohydrogen from green microalgae. *PhD, University of Bergen*, p5.
- Sayegh F.A.Q. &Montagnes D.J.S., 2011.** Temperature shifts induce intraspecific variation in microalgal production and biochemical composition. *Bioresource Technology*, **102(3)**, 3007- 3013.
- Sialve B., Steyer J.P., 2013.** Les microalgues, promesses et défis, *Innovations Agronomiques*, **26** : 25-39.
- Sierra E., Acien F.G., Fernandez J.M., Garcia J.L., Gonzalez C., Molina E., 2008.** Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae. *Chemical Engineering Journal*. **138**: 136-47.
- Singh R., Sharma S., 2012.** Development of suitable photobioreactor for algae production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **16**: 2347-2353.
- Sharma N.K., Rai A.K., 2011.** Biodiversity and biogeography of mircoalgae. *Progress and pitfalls*, **19**: 1-15.
- Sheehan J., Dunahay T., Benemann J., Roessler P., 1998.** Part II Technical review In A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program - Biodiesel from Algae. *In National Renewable Energy Laboratory*, p328.
- Solomon CM., Glibert PM., 2008.** Urease activity in five phytoplankton species. *AquatMicrob Eco*, **52**:149-157.
- Solovchenko A., Khozin-Goldberg I., 2013.** High- CO₂ tolerance in microalgae: possible mechanisms and implications for biotechnology and bioremediation. *Biotechnol Lett*, **35**: 1745.
- Spijkerman E., 2007.** Phosphorus acquisition by *Chlamydomonas acidophila* under autotrophic and osmo-mixotrophic growth conditions. *Journal of Experimental Botany*, **58**, 4195-4202.
- Spolaore P. Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A., 2006.** Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **101**: 87-96.
- Steffii F., Brendan N M., 2003.** Nitrate and Phosphate Levels Positively Affect the Growth of Algae Species Found in Perry Pond. *Grinnell College*. **4**: 21-24.

- Stolz, P., Obermayer, B., 2005.** Manufacturing microalgae for skin care. *CosmeticsToiletries*, **120**: 99-106.
- Strickland J.D.H., Parsons T.R., 1968.** A practical handbook of seawater analysis. Queen's Printer.
- Su F.S., Lu C.S., Cnen W.F., Bai H.L., Hwang J.F., 2009.** Capture of CO₂ from flue gas via multiwalled carbon nanotubes. *Science of the Total Environment*, **407**: 3017-3023.
- Sumi, Y., 2009.** Microalgae Pioneering the Future: Application and Utilization. *Life Science*, p34.
- Sun SJ., Guo SQ., Yang X., Bao YM., Tang HJ., Sun H., Huang J., Zhang HS., 2010.** Functional analysis of a novel Cys2/His2-type zinc finger protein involved in salt tolerance in rice. *J Exp Bot*, **61** : 2807-18.
- Tahiri M., Benider A., Belkoura M. &Dauta A., 2000.** Caractérisation biochimique de l'algue verte *Scenedesmus abundans* : influence des conditions de culture. *Ann. Limnol*, **36(1)**: 3-12.
- Takagi, M., Karseno, Yoshida T., 2006.** Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cell. *J BiosciBioeng*, **101** : 223-226.
- Taleb A., 2015.** Production de biodiesel à partir des microalgues : recherche des souches accumulatrices des lipides et optimisation des conditions de culture en photobioréacteurs, *Laboratoire GEPEA, UMR-CNRS 6144 Centre AZM pour la recherche en biotechnologie et ses applications*.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipiak A., Kumar S., 2013.** MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **30**: 2725-2729.
- Tanzi CD., Vian MA., Chemat F., 2013.** New procedure for extraction of algal lipids from wet biomass: a green clean and scalable process. *Bioresour Technol*, **134**: 271-275.
- Tapiero H., Townsend D.M., Tew K.D., 2004.** The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, **58**: 100-110.
- Teoh M-L., Chu W.L., Marchant H., Phang S.M. 2004.,** Influence of culture temperature on the growth, biochemical composition and fatty acid profiles of six Antarctic microalgae. *J ApplPhycol*. **16** : 421-430.
- Terauchi A. M., Peers G., Kobayashi M. C., Niyogi K. K., Merchant S. S., 2010.** Trophic status of *Chlamydomonas reinhardtii* influences the impact of iron deficiency on photosynthesis. *Photosynthesis research*, **105**: 39-49.
- Tredici M. R., 2004.** Mass production of microalgae: Photobioreactors. *Biotechnology and Applied Phycology*, p 566.
- Turner M.F., 1970.** A note on nutrition of *Rhodella*. *British Phycological Journal*, **5(1)**: 15-18.
- Uaratini M.T., Jessen R.C., Cardoso-Lopes E.M., Torres L.M.B., 2009.** Allelopathic potential of *Aulonemia aristulata* (Doll) MacClure, a native bamboo of Atlantic Rain Forest. *Allelopathy Journal*, **24**:183-190.

- Vadrucci M.R., Mazziott C., Fiocca A., 2013.** Cell biovolume and surface area in phytoplankton of Mediterranean transitional water ecosystems: methodological aspects. *Transit. Waters Bul*, **7(2)**: 100-123.
- Van Den Hoek, C., 1995.** Algae: An introduction to phycology. *Cambridge University Press edition*, p 623.
- Vanlerberghe GC, Schuller KA, Smith RG, Feil R, Plaxton WC, Turpin DH., 1990.** Relationship between NH_4 + assimilation rate and in vivo phosphoenolpyruvate carboxylase activity: regulation of anaplerotic carbon flow in the green alga *Selenastrum minutum*. *Plant Physiol*, **94**:284-290.
- Varela D. E., Willers Crawford D. W., 2011.** Effect of zinc availability on growth, morphology, and nutrient incorporation in a coastal and an oceanic diatom. *Journal of Phycology*, **47(2)**: 302-312.
- Vidyashankar S., Deviprasad K., Chauhan V., Ravishankar G. & Sarada R., 2013.** Selection and evaluation of CO_2 tolerant indigenous microalga *Scenedesmus dimorphus* for unsaturated fatty acid rich lipid production under different culture conditions. *Bioresource Technology*, **144**: 28-37.
- Villay A., Laroche C., Roriz D., El Alaoui H., Delbac F., Michaud P., 2013.** Optimisation of culture parameters for exopolysaccharides production by the microalga *Rhodella violacea*. *Bioresource technol*, **146**: 732-735.
- Vonshak A., Guy, R., Poplawsky R., Ohad I., 1988.** Photoinhibition and its recovery in two different strains of *Spirulina*. *Plant and Cell Physiology*, **29**: 721.
- Voronova E. N., Konyukhov I. V., Yu Pogosyan S. I., Rubin A. B., 2008.** Changes in the condition of photosynthetic apparatus of a diatom alga *Thalassiosira weissflogii* during photoadaptation and photodamage. *Russian Journal of Plant Physiology*, **56 (6)**: 753-760.
- Wahidin S., Idris A., Shaleh S.R.M., 2013.** The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis sp.* *Bioresource technology*, **129**: 7-11.
- Watanabe, T., Kitajima, C., Fujita, S., 1983.** Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: A review. *Aquaculture*, **34**: 115-143.
- Wan C., Bai F.W., Zhao X.Q., 2013.** Effects of nitrogen concentration and media replacement on cell growth and lipid production of oleaginous marine microalga *Nannochloropsis oceanica* DUT01. *Biochemical Engineering Journal*, **45(1)**:11-36.
- Wang L., Li Y., Sommerfeld M., Hu Q., 2013.** A flexible culture process for production of the green microalga *Scenedesmus dimorphus* rich in protein, carbohydrate or lipid. *BioresourceTechnology*. **129**: 289-295.
- Wang B, Li Y, Wu N, Lan CQ., 2008.** CO_2 bio-mitigation using microalgae. *Appl. Microbiol. Technol*, **79**: 707-718.
- Wen Z. & Johnson M.B., 2009.** Microalgae as a feedstock for biofuel production. *Virginia Cooperative Extension Publication*, pp. 442-886.
- White D. A., Pagarette A., Rooks P. & Ali S. T., 2013.** The effect of sodium bicarbonate supplementation on growth and biochemical composition of marine microalgae cultures. *J. Appl. Phycol.* **25**: 153-165.
- Wijffels R. H. & Barbosa M. J., 2010.** An outlook on microalgal biofuels. *Science*, **329(5993)**: 796-799.



- Wim Brilman L.G. & Alba R.V., 2013.** Capturing atmospheric CO_2 using supported amine sorbents for microalgae cultivation. *Biomass and Bioenergy*, **53**:39-47.
- Xin L., Hong-ying H., Yu-ping Z. 2011.** Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus sp.* under different cultivation temperature. *Bioresour. Technol.*, **102**(3): 3098-3102.
- Xu X-Q., Beardall J., Hallam N.D., 1998.** Modification of fatty acid composition in halophilic antarctic microalgae. *Phytochemistry*, **49**(5): 1249-1252.
- Xue J., Rai V., Singer D, Chabierski S., Xie J., Reverdatto S, Burz DS., Schmidt AM, Hoffmann R, Shekhtman A., 2011.** Advanced glycation end product recognition by the receptor for AGE. *Structure*, **19**:722-732.
- Yang Y. & Gao K., 2003.** Effects of CO_2 concentrations on the freshwater microalgae, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyta). *J Appl Phycol*, **15**: 379-389.
- Yeh K.-L., Chang J.S., Chen W.m., 2010.** Effect of light supply and carbon source on cell growth and cellular composition of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Eng. Life Sci.* **10** (3): 201-208.
- Yim W.W., Chan L.S., Hsieh M., Philp R.P., Ridley Thomas W.N., 2002.** Carbon flux during the last interglacial cycle in the inner continental shelf of the South China Sea off Hong Kong, *Global Planet. Change*, **33**: 29-45.
- Yun Y.S., Lee B.S., Park T.M., Lee C., Yang J.W., 1997.** Carbon dioxide fixation by algal cultivation using waste water nutrients. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **69**: 451-455.
- Zame K.K., 2010.** Carbon capture using the microalgae *Chlorella vulgaris* in a packed bubble column photobioreactor. PhD, Youngstown State University, USA.
- Zeng X., Danquah M. K., Chen X. D. & Lu Y., 2011.** Microalgae bioengineering: from CO_2 fixation to biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **15**: 3252-3260.
- Zer, H. and I. Ohad, 2003.** Light, redox state, thylakoid-protein phosphorylation and signaling gene expression. *Trends Biochem. Sci.*, **28** : 467-470.
- Zhang Q. B., Yu P. Z., Li Z., Zhang H., Xu Z. H., Li P. C., 2003.** Antioxidant activities of sulfated polysaccharide fractions from *Porphyrahaitanensis*. *Journal of Applied Phycology*, **15**: 305-310.
- Zhen-Feng S., Xin L., Hong-Ying H., Yin-Hu W., Tsutomu N., 2011.** Culture of *Scenedesmus sp.* LX1 in the modified effluent of a wastewater treatment plant of an electric factory by photo membrane bioreactor. *Bioresour. Technol.*, **102**: 7627-7632.
- Zhu M., Zou PP. & Yu LJ. 2002.** Extraction of lipids from *Mortierella alpine* and enrichment of Arachidonic Acid from the Fungal Lipids. *Bioresour. Technol.*, **13**: 84-93.

ANNEXE 1 : Extraction de l'ADN génomique

L'ADN est extrait à partir de 10 ml de culture microalgale en phase exponentiel ($20 \cdot 10^7$ cellule/ml), en utilisant un kit (EasyPure Plant Genomic DNA Kit).

Composant	EE111-01 (50 rxns)	EE111-02 (200 rxns)
Buffer1 (RB1)	15 ml	60 ml
Buffer1 (PB1)	6 ml	25 ml
Buffer1 (CB)	30 ml	110 ml
Buffer1 (BB1)	8 ml	32 ml
Buffer1 (WB1)	12 ml	2 × 22 ml
Tampon d'élution (EB)	25 ml	80 ml
RNase A (20 mg/ml)	800 µl	4 × 800 µl
SDS 10%	2 ml	10 ml
Colonne avec Tubes collecteur	50	2 × 100

- Toutes les étapes de centrifugation sont réalisées à température ambiante.
 1. Récupérer 100 mg de microalgue (culot) après centrifugation.
 2. Ajouter 250 µl de RB1 au culot et bien mélanger au vortex
 3. Ajouter 30 µl de SDS à 10% et 15 µl de La Rnase.
 4. Incuber à 55°C dans un bain d'eau pendant 15 minutes.
 5. Centrifugé à 12,000 rpm pendant 5 minutes, transférer doucement le surnageant dans un microtube stérile.
 6. Ajouter 100 µl de PB1, bien mélangé au vortex, incuber sur glace pendant 5 minutes, centrifugées à 12000 rpm pendant 5 minutes.
 7. Transférer Doucement le surnageant dans un microtube stérile, ajouter 375 µl de BB1 (vérifié que vous avez ajouté de l'éthanol avant utilisation), bien mélangé.
 8. Mettre dans la spin colonne, centrifugé à 12,000 rpm pendant 30 secondes.
 9. Ajouter 500 µl de CB1, centrifugé à 12,000 rpm pendant 30 secondes.
 10. Ajouter 500 µl de WB1 (vérifier pour vous assurer que vous avez ajouté de l'éthanol avant utilisation), centrifugé à 12,000 rpm pendant 30 secondes.
 11. Répétez l'étape 10 une fois.
 12. Centrifugé à 12,000 rpm pendant 2 minutes pour éliminer les résidus du WB1.
 13. Placé la colonne dans un microtube stérile de 1.5 ml, ajouter 50-200 µl de Tampon d'élution (préchauffé à 60 °C) ou de l'eau distillée (pH > 7.0), incuber à température ambiante pendant 1 minute, centrifugé à 12,000 rpm pendant 1 minute.

Pour le stockage à long terme, conservé L'ADN purifié à -20 °C.

ANNEXE 2 : Composition du milieu f/2 Guillard (Guillard and Ryther 1963)

Quatre solutions mères (1-4) ; pour toutes les solutions, l'utilisation de l'eau distillée stérilisée.

		1 L	0,5 L
1.	Solution stock de $NaNO_3$	75,0 g	37,5 g
2.	Solution stock de NaH_2PO_4	5,0 g	2,5 g

3. Solution stock de Métaux Trace :

A l'eau distillée ajouté :

	1 L	0,5 L
Na_2EDTA	4,36 g	2,18 g
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (Chlorure ferrique)	3,15 g	1,575 g
Stocks de métaux primaires (ci-dessous)	1 mL des cinq	0,5 mL des cinq

- Solution stock primaire de métaux traces

Pour le volume choisi d'eau distillée stérile ajouter :

	100 mL	50 mL	10 mL
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	1,0 g	0,50 g	0,10 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2,2 g	1,10 g	0,22 g
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,0 g	0,50 g	0,10 g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1,8 g	0,90 g	0,18 g
$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	0,63 g	0,315 g	0,063 g

4. Solution stock de Vitamine :

Sensible à la lumière la solution de vitamine doit être couverte de papier aluminium :

	1 L	0,5 L
Biotine	10 mL de 0,1 mg•mL ⁻¹ solution (1mg dans 10 mL)	5 mL
Vitamine B1	1 mL de 1 mg•mL ⁻¹ solution (1 mg dans 1 mL)	0,5 mL
Thiamine	0,2 g	0,1 g

Préparation du milieu final :

Dans 950 ml d'eau distillée ajouté : Solution stock de $NaNO_3$ 1 mL

Solution stock de NaH_2PO_4 1 mL

Solution stock de Métaux Trace 1 mL

Solution stock de Vitamine 0,5 mL

ANNEXE 3 : Dénombrement cellulaire

La concentration en nombre de cellules présente dans la suspension microalgale est déterminée pour toutes les souches au microscope optique (objectif 40) par comptage sur hématimètre de type Malassez, présenté dans la figure 104.

La cellule de Malassez est une lame spéciale en verre (figure 104) développée pour le comptage de diverses cellules animales et végétales. Elle est munie de deux chambres de comptage sur la surface supérieure, et sur lesquelles est placée une lamelle de verre spéciale (plaque couvre-objet) délimitant une profondeur de 0.2 mm (figure 105). Chaque chambre de comptage est gravée horizontalement et verticalement. Cette gravure précise trace un quadrillage dont on connaît les dimensions. Comme schématisé dans la (figure 98), chaque chambre de comptage est donc un quadrillage composé de 25 grands rectangles dont les dimensions sont connues (0.25 de longueur et 0.25 mm de largeur), chacun est subdivisé en 20 petits carrés de 0.05 mm de côté (figure 105).

Le principe d'utilisation est simple. Connaissant les dimensions des rectangles de comptage, ainsi que le volume de comptage de la cellule, la concentration cellulaire dans le PBR (après comptage) sera mesurée grâce au calcul expliqué ci-après. Chaque rectangle a un volume de $0,2 \times 0,2 \times 0,25 = 0,01 \text{ mm}^3$. La totalité de la cellule, soit 100 rectangles de $0,20 \times 0,25 \text{ mm}$, a un volume de $0,2 \times 2 \times 2,5 = 1 \text{ mm}^3$ soit 10^{-3} ml . En prenant en considération le facteur de dilution ($f = V_f V_i$) dans le cas d'une culture préalablement diluée, la concentration N (Nombre de cellules/ml de la culture) est calculée comme suit : $N = n \times 25 \times f \times 10^{-5}$ avec « n » désignant le nombre total des cellules comptées dans l'ensemble des 25 rectangles. Il faut noter qu'afin que la concentration calculée soit précise, il faut compter au moins 300 cellules pour chaque échantillon.

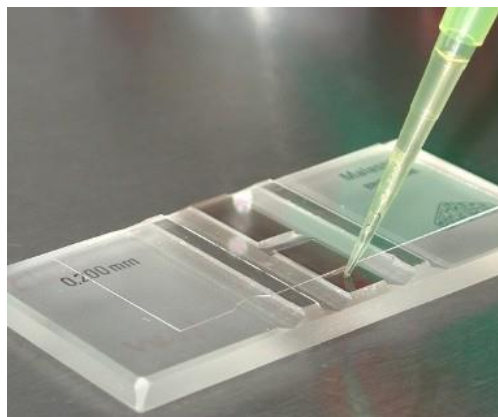


Figure 104 : Photo d'une cellule de Malassez

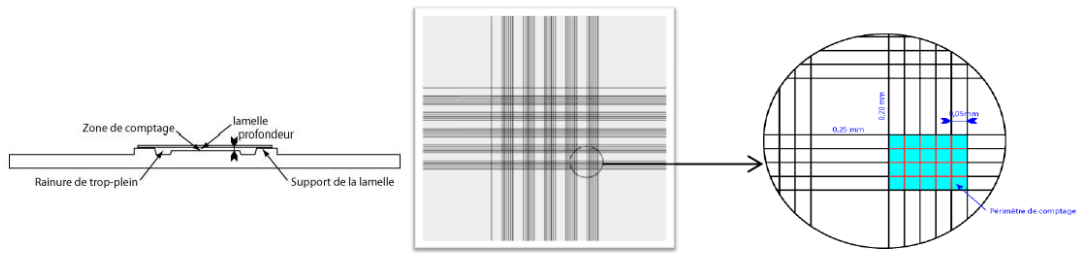
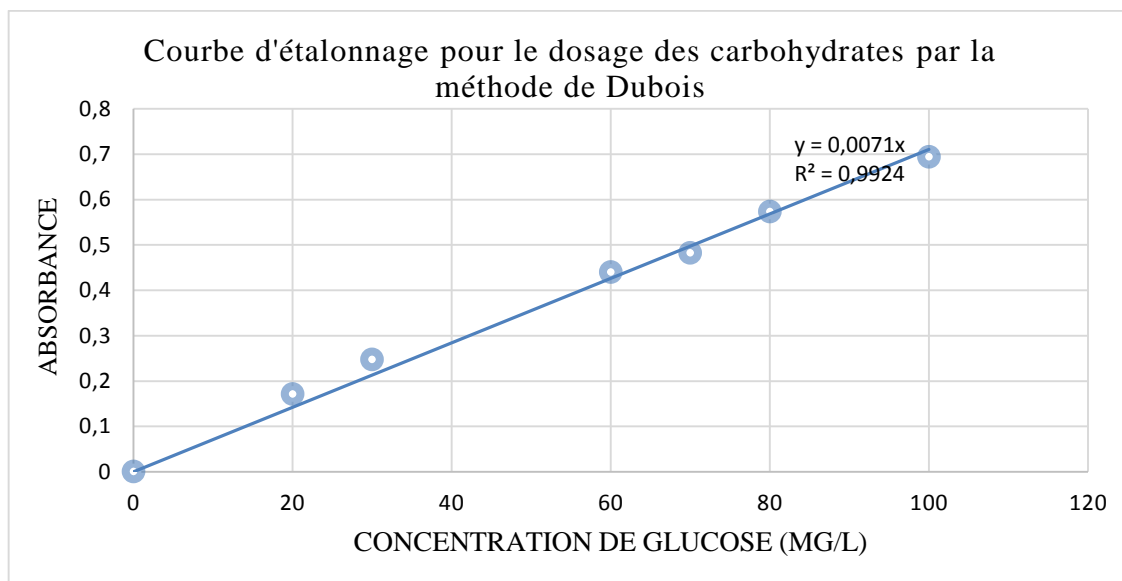
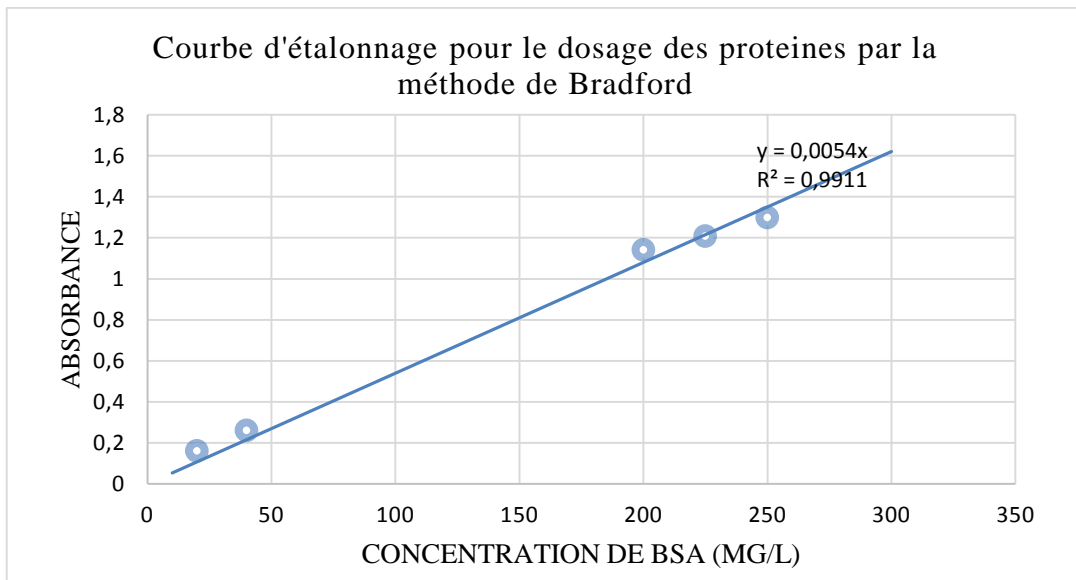


Figure 105 : Vue d'une coupe et de la gravure d'une cellule de Malassez

ANNEXE 4 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des carbohydrates par la méthode de Dubois

ANNEXE 5 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode de Bradford

ANNEXE 6 : Les paramètres indicateurs de la qualité de l'eau piscicole

LES NORMES MAROCAINES

Arrêté conjoint du ministre chargé de l'aménagement du territoire, de l'eau et de l'environnement n° 2027-03 du 5 novembre 2003 fixant les normes de qualité des eaux piscicoles.

Article 1 : En application des articles 1 et 2 du décret susvisé n° 2-97-787, les normes de qualité des eaux piscicoles sont fixées au tableau annexé au présent arrêté.

Article 2 : Au sens du présent arrêté, on entend par : Eaux piscicoles : toutes les eaux courantes ou stagnantes dans lesquelles vivent ou pourraient vivre les poissons et mollusques et classées en eaux froides et en eaux tièdes ; Eaux froides : les eaux piscicoles dans lesquelles vivent ou pourraient vivre les poissons d'eaux froides tels que les espèces de la famille des salmonidés : les truites, les saumons, les ombres, les corégones... ; Eaux tièdes : les eaux piscicoles dans lesquelles vivent ou pourraient vivre les poissons autres que les salmonidés : carpes, brochet, perche, sandre, black-bass, anguille, alose... Echantillon composite : tout mélange de façon intermittente ou continue en proportions adéquates d'au moins trois (3) échantillons ou parties d'échantillons par jour et dont peut être obtenue la valeur moyenne du paramètre désiré.

Article 3 : Une eau est dite de qualité piscicole si des échantillons de cette eau prélevés à un intervalle régulier et à un même lieu de prélèvement présentent des valeurs de paramètres conformes aux normes de qualité des eaux piscicoles pour au moins : - 95% des mesures de tous les paramètres, - 90% des mesures pour un paramètre donné, - si les valeurs des paramètres non conformes aux normes de qualité des eaux piscicoles ne dépassent pas la limite de 50%, exception faite pour la T°, le PH, l'oxygène dissous et les paramètres bactériologiques.

Article 4 : Le nombre minimal d'échantillons sur la base duquel une eau est dite piscicole est de 12 par an à raison d'un échantillon par mois.

Article 5 : Tout échantillon sur la base duquel l'eau est dite piscicole doit être un échantillon composite de 24 heures.

Article 6 : Les échantillons prélevés lors des inondations, des pollutions accidentelles ou de catastrophes naturelles ne sont pas considérés pour l'appréciation globale de la qualité des eaux piscicoles.

Article 7 : En cas de nécessité, l'agence de bassin hydraulique concernée peut proposer la fixation pour les eaux piscicoles de valeurs plus sévères que celles prévues par le présent arrêté.

Article 8 : Les paramètres indicateurs de la qualité de l'eau piscicole sont mesurés selon les méthodes normalisées.

Article 9 : L'agence de bassin est chargée de l'application du présent arrêté.

Article 10 : Le présent arrêté est publié au Bulletin Officiel.

Tableau 42 : Norme de qualité d'eaux piscicole marocaine

	Paramètres	Eaux froides	Eaux tièdes
1	Temp tièdesslité	5 < T < 20	8 < T < 30
2	pH	5 < T	5 < T
3	OxygT < 30sslité d'eaux p	>5	>3
4	MatiT < 30sslité d'eau	< 25	< 50
5	DCO (mgO2/l)	< 20	< 30
6	DBO5 (mgO2/l)	<3	<6
7	Chlore libre (mg/l)	< 0,02	< 0,02
8	Conductivite (mg/l)	< 350	< 3000
9	Ammoniac non ionis) 2/l) isc3)	< 0,025	< 0,025
10	Ammonium (mg/l NH4+)	< 0,50	< 1
11	Nitrite (mg/l NO2-)	< 0,5	< 0,5
12	D20,5te (mg/l NO2-	< 0,5	< 0,5
13	Sulfates (mg/l)	< 200	< 200
14	Hydrocarbures dissous ou isc3) le marocaine	< 10	< 10
15	Hydrocarbures polycycliques aromatiques (g/l)	< 0,2	< 0,2
16	Ph0,2 carbures polycycliques aromatiques	<1	< 1
17	Cyanures (g/l CN)	< 50	< 50
18	Argent (g/l Ag)	<3	<3
19	Fluorures (mg/l F)	< 0,7	< 0,7
20	Pesticides (g/l)	< 0,1 pour substance Individual isubstance	< 0, 1 pour substance Individual
Métaux lourds			
21	S1 taux lourds substa	< 10	< 10
22	Barym (mg/l)	< 1	< 1
23	Bore (mg/l B)	< 2	< 2
24	Manganmg/l B) bst	< 0,1	< 0,1
25	Mercure (g/l Hg)	< 1	< 1
26	Plomb (g/l Pb)	< 20	< 20
27	Arsenic (g/l As)	< 50	< 50
28	Chrome total (g/l Cr)	< 50	< 50
29	Cadmium (g/l Cd)	< 5	< 5
30	Cuivre (a) (g/l Cu)	< 40	< 40
31	Zinc (a) (mg/l Zn)	< 1,3	< 1,3
Bactériologiques			
32	Coliformes	< 2000	< 2000

LES NORMES EUROPEENNES

Concernant la qualité des eaux douces ayant besoin d'être protégées ou améliorées pour être aptes à la vie des poissons (version codifiée) du 6 septembre 2006.

1. La présente directive concerne la qualité des eaux conchylicoles et s'applique aux eaux côtières et aux eaux saumâtres désignées par les États membres comme ayant besoin d'être protégées ou améliorées pour permettre la vie et la croissance des coquillages (mollusques bivalves et gastéropodes) et pour contribuer ainsi à la bonne qualité des produits conchylicoles directement comestibles par l'homme.

2. Les États membres fixent, pour les eaux désignées, des valeurs pour les paramètres indiqués à l'annexe I, dans la mesure où des valeurs apparaissent dans la colonne G ou I. Ils se conforment aux remarques figurant dans ces deux colonnes.

En ce qui concerne les rejets des substances relevant des paramètres «substances organohalogénées» et «métaux», les normes d'émission établies par les États membres en application de la directive 2006/11/CE du Parlement européen et du Conseil du 15 février 2006 concernant la pollution causée par certaines substances dangereuses déversées dans le milieu aquatique de la Communauté (1) sont appliquées en même temps que les objectifs de qualité ainsi que les autres obligations découlant de la présente directive, notamment celles relatives à l'échantillonnage.

L'application des mesures prises en vertu de la présente directive ne peut en aucun cas avoir pour effet d'accroître, directement ou indirectement, la pollution des eaux côtières ou des eaux saumâtres.

Tableau 43 : Normes de qualités d'eaux piscicoles européennes

Paramètre	Eaux salmonicoles		Eaux cyprinicoles		Méthodes d'analyse ou d'inspection	Fréquence minimale d'échantillonnage et de mesure	Observations
	Guide	Impérative	Guide	Impérative			
1 Température (°C)		La température mesure en aval d'un point de rejet thermique (à la limite de la zone du mélange) ne doit pas dépasser la température naturelle de plus de:			Thermométrie	Hebdomadaire en amont et en aval du point de rejet thermique	Des variations trop brusques de température doivent être évitées
		1,5°C		3°C			
		Des dérogations limitées géographiquement peuvent être décidées par les états membres dans des conditions particulières si l'autorité compétente peut prouver que ces dérogations n'auront pas de conséquences nuisibles pour le développement équilibré des peuplements de poissons					
	2	Les rejets thermiques ne doivent pas avoir pour conséquence que la température dans la zone située en aval du point de rejet thermique (à la limite de la zone de mélange) dépasse les valeurs suivantes:					
		21,5(0)		28(0)			
		10(0)		10(0)			
	Période de reproduction des espèces ayant besoin d'eau froide pour leurs reproductions, et uniquement ou susceptible de contenir de telles espèces Les limites de température peuvent toutefois dépassées pendant 2% du temps						
2.Oxygène dissous (mg/o ₂)	50% ≥ 9 100% ≥ 7	50% ≥ 9 Lorsque la teneur en oxygène descend en dessous de 6 mg/l, les états membres mettent en oeuvre les dispositions de l'article 7 paragraphe 3.	50% ≥ 9 100% ≥ 5	50% ≥ 7 Lorsque la teneur en oxygène descend en dessous de 4 mg/l les états membres mettent en oeuvre les dispositions de l'article 7 paragraphe 3 l'autorité	Méthode de winkler ou électrodes spécifiques (méthode électrochimique)	Moins un échantillon représentatif des faibles teneurs en oxygène se présentant le jour du prélèvement Toutefois, s'il y a presumption de variations diurnes	

		L'autorité compétente doit prouver que cette situation n'aura pas de conséquences nuisibles pour le développement équilibré des peuplements de poisson		compétent doit prouver que cette situation n'aura pas de conséquences nuisibles pour le développement équilibré des peuplements de poisson		significatives au moins deux prélèvements par jour seront effectués	
3. pH		6-9 (0) (1)		6-9 (0) (1)	Électrométrie étalonnage au moyen de deux solutions tampons de pH connus voisins et de préférence situé de part et d'autre de la valeur du pH à mesurer	Mensuelle	
4. Matières en suspension (mg/l)	≤ 25 (0)		≤ 25(0)		Par filtration sur membrane filtration 0,45 µm ou par centrifugation (temps minimal de 5 minutes accélération moyenne de 2800-3200 g) séchage à 105°C et pesée		Les valeurs indiquées se réfèrent à des concentrations moyennes et ne s'appliquent pas aux matières en suspension ayant des propriétés chimiques nocives Les inondations sont susceptibles de provoquer des concentrations particulièrement élevées
5. DBO5 (mg/l)	≤ 3		≤ 6		Détermination de O ₂ par la méthode de Winkler avant et Après incubation de 5 jours dans l'obscurité totale, à 20±1 °C (sans empêcher la nitrification)		
6. Phosphore total (mg/l)					Spectrophotométrie d'absorption moléculaire		En ce qui concerne les lacs dont la profondeur moyenne se situe entre 18 et 300 m, on pourrait appliquer la formule suivante: $L \leq 10ZTw(1+ T)$ Ou L = charge exprimée en mg par mètre carré de

							<p>surface du lac pendant une année</p> <p>Z = profondeur moyenne du lac exprimée en mètres</p> <p>Tw = temps théorique de renouvellement de l'eau du lac exprimé en années</p> <p>Dans les autres cas, les valeurs limites de 0,2 mg/l pour les eaux salmonicoles et de 0,4 mg/l pour les eaux cyprinicoles, exprimées en PO4 peuvent être considérées comme des valeurs indicatives permettant de réduire l'europhisation</p>
7. Nitrites	≤ 0,01		≤ 0,03		Spectrophotométrie d'absorption moléculaire		
8. Composes phénoliques (mg/l C6H5OH)		(2)		(2)	Examen gustatif		L'examen gustative n'est effectué que si la présence de composés phénoliques est présumée
9. Ammoniac non ionisé (mg/l NH4)	≤ 0,05	≤ 0,025	≤ 0,005	≤ 0,025			
10. Zinc total (mg/l Zn)	≤ 0,3		≤ 0,3		Spectrométrie d'absorption atomique	Mensuelle	Les valeurs I correspondent à une dureté de l'eau de 100 mg/l de CaCO3 Pour des duretés comprises entre 10 et 500 mg/l, les valeurs limites correspondantes peuvent être trouvées à l'annexe II
11. Cuivre soluble (mg/l Cu)	≤ 0,04		≤ 0,04		Spectrométrie d'absorption atomique	Les valeurs G correspondent à une dureté de l'eau de 100 mg/l de CaCO3 Pour des duretés comprises entre 10 et 300 mg/l, les valeurs limites correspondantes peuvent être trouvées à l'annexe II	Les valeurs pour l'ammoniac non ionisé peuvent être dépassées, à condition qu'il s'agisse de pointes peut importantes apparaissant pendant la journée

Résumé

La culture de microalgues est soumise à l'influence de plusieurs paramètres environnementaux physiques ou biologiques qui sont dépendants des caractéristiques intrinsèques de l'espèce microalgale 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 de la cellule. La première partie de cette thèse examine la biodiversité microalgale de l'estuaire de l'Oued Chélif (Algérie) ; ce screening nous a permis d'observer, recenser et d'isoler des espèces appartenant à différentes classes. Néanmoins seules trois souches ont fait l'objet de la deuxième partie de cette étude expérimentale (*Scenedesmus sp*, *Tetranephris brasiliensis* et *Nannochloropsis gaditana*). Les résultats obtenus ont souligné une grande différence comportementale des souches (microalgue marine/eau douce) en termes de croissance, de métabolisme et de fragilité cellulaire, leur réponse est souche dépendante avec une certaine similitude pour celles appartenant à la même famille. Une fois discerné l'effet des différents paramètres physico-chimiques, des verrous subsistent, les milieux de culture destinés à la production de la biomasse impliquent des coûts élevés. Il apparaît donc intéressant d'utiliser et valoriser l'enrichissement de ses effluents, de façon à orienter la production végétale vers des microalgues particulières. Les effluents de pisciculture se révèle favorable à la production de microalgues sans engendrer d'inhibition significative. Néanmoins des rééquilibrages en nutriments sont nécessaires en particulier pour augmenter la production.

Mots clés :

Microalgue; Screening; *Nannochloropsis gaditana*; *Tetranephris brasiliensis*; *Scenedesmus sp.*; Paramètres physico-chimiques; Production en masse; Croissance cellulaire; Caractérisation biochimique; Effluents de pisciculture.