

لجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر وتهيئة الساحل

Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
MASTER EN SCIENCES DE LA MER

OPTION : AQUACULTURE

Contribution à la mise en culture des micro-algues (*Chlorella* et *Scenedesmus* sp) : identification, isolement, purification et culture en batch.

Présenté par -BerdiAbderahim

- Hallak Fahd

Soutenu le 31/10 /15 devant le jury suivant :

Mr Soufiane O	Maître de conférences B (ENSSMAL)	Président
Mme Meslem.N	Maître assistante A(ENSSMAL)	Examinatrice
Mr Belhasnat. K	Maître de conférences B (ENSSMAL)	Examineur
Mme Merdjane.L	Maître assistante A (ENSSMAL)	Promotrice

Promotion : 2014/2015

Remerciements

Nous remercions Dieu de nous avoir donné la patience de suivre nos études et de faire ce modeste travail.

Nous tenons à remercier M^{me} MESLEM d'avoir accepté de présider ce jury en dépit de ses nombreuses occupations.

C'est avec un grand plaisir que nous remercions.

Mr BELHASNAT K et Mr Soufiane O pour avoir pris le temps d'examiner ce travail et pour leurs critiques constructives.

Nous remercions la personne à qui nous devons le plus, Melle MERDJANE L, Enseignante à l'ENSSMAL, qui a encadré et dirigé cette étude ; elle nous a fait bénéficier, de son expérience, ses connaissances judicieuses et de ses discussions stimulantes qui ont fait avancer ce travail. Nous sommes profondément reconnaissants pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail.

Nous remercions aussi tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

A nos très chers parents.

A nos chères sœurs et frères.

A tous nos amis.

A tous ce qui nous ont soutenu.

Nous dédions ce modeste travail.

Résumé

L'étude présente contribue à la recherche et la culture en batch des deux espèces de micro-algues (*Chlorella sp* et *Scenedesmus sp*) et le contrôle des différents paramètres de culture.

Elle porte également sur l'isolement, la sélection et l'identification de ces deux espèces qui ayant des applications directes dans les domaines agricoles, industriels et particulièrement en alimentation et en aquaculture. L'accès à cette ressource nécessite une maîtrise et une connaissance parfaite des conditions de culture et de production de ces micro-algues à l'échelle du laboratoire sur milieu artificiel.

Mots clés : *Chlorella sp*, culture, batch.

Abstract

The present study contributes to research and culture in batch of two species of microalgae (*Chlorella sp* and *Scenedesmus sp*) and control of different cultivation parameters.

It also covers the isolation, selection and identification of these two species that have direct applications in the fields of agriculture, industry and particularly in food and aquaculture. Access to this resource requires a master and perfect knowledge of the culture conditions and production of these microalgae in laboratory scale in artificial medium.

Keywords: Chlorella, culture, batch

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction..... 12

Partie I : Généralités

I-Généralités 14

1-Définition des algues 14

2-Définition des micro-algues 14

3- Critères de classification des micro-algues 14

4-Différents groupes de micro-algues 15

4-1-Les procaryotes 15

4.2-Les eucaryotes 15

5- Domaines d'utilisation des micro-algues 17

6- Mode de nutrition 19

7-Reproduction des micro-algues 20

8-Composition biochimique 21

9-Critères de sélection 23

II-Présentation des micro-algues utilisées

a) *Chlorella sp* 23

1-Présentation 23

2-Systématique 24

3-Composition 24

4-Reproduction	25
5-Domaine d'utilisation	25
6-Mode de nutrition	25
b)- <i>Scenedesmus sp</i>	25
1-Présentation	25
2-Systematique	26
3- Composition	27
4- Reproduction	27
5- Domaine d'utilisation	27
6- Mode de nutrition	27
III-Culture des micro-algues	27
1- Les systèmes de production	27
2- Les conditions de culture des micro-algues	30
2-1-Les conditions physiques	30
2-2 Les conditions chimiques	33
3-Les techniques de culture des micro-algues	34
3-1-La préparation de la souche	34
3-2-La purification des cultures	35
3-3-Les cultures mères	35
3-4-Le contrôle du développement algal	35
4- La récolte	37
4-1-La centrifugation	37
4-2-La filtration	38

4-3-Lyophilisation.....	38
-------------------------	----

Partie 2 Matériel et méthodes

1-Objectif	41
2-Matériel utilisé	41
2-1-Matériel biologique.....	41
2-2-Matériel et équipements utilisés.....	42
3- Echantillonnage	43
4-Méthodes.....	43
4-1-Identification et entretien des micro-algues.....	43
4-2- Isolement	45
4-3-Le repiquage	46
4-4-Les conditions d'incubations.....	46
4-5-Ensemencement.....	47
4-6-Procédure de la culture.....	47
4-7-Purification de milieu de culture par stérilisation à l'autoclave	48
4-8-Entretien des cultures.....	48
4-9-Etude biométrique de la culture (cinétique)	49

Partie 3 Résultats et discussion

1-Identification des souches.....	54
1-1-Espèce <i>Chlorella sp</i> :	54
1-2-Espèce <i>Scenedesmus sp</i>	55
2-Résultats.....	55
2-1-Calcul de la concentration cellulaire	55

2-2-Taux de croissance spécifique de <i>Chlorella sp</i>	58
3-Interprétation des résultats	58
Conclusion	63
Références Bibliographiques	64
Annexe	

Listes des figures

Figure 1 : *Chlorella vulgaris*

Figure 2 : *Scenedesmus sp*

Figure 3 : Système de culture de type raceway

Figure 4 : Photo bioréacteur plats, tubulaires, en colonnes

Figure 5 : Les longueurs d'ondes permettant le développement de la micro-algue

Figure 6 : Développement de la micro-algue en fonction de l'intensité lumineuse.

Figure 7 : Aquariums de la ferme expérimentale à base desquelles les échantillons ont été prélevés.

Figure 8 : Échantillons de micro-algues prélevés depuis les aquariums de la ferme (ENSSMAL).

Figure 9: Observations des lames aux différents grossissements sous microscope optique.

Figure 10 : Les composants des milieux de culture (Mayer et Provasoli).

Figure 11 : Remplissage des boîtes de pétri par la gélose.

Figure 12 : Le repiquage des micro-algues dans des boîtes de pétri dans un milieu solide.

Figure 13 : Les étapes de la culture des micro-algues

Figure 14: Introduction des micro-algues dans la zone de comptage.

Figure 15: Observation de *Chlorella sp* sous microscope GX10.

Figure 16 : Quadrillage de la cellule de Malassez.

Figure 17 : Le volume de comptage de la cellule de Malassez.

Figure 18: La surface du quadrillage.

Figure 19 : La profondeur de la chambre.

Figure 20 : Numération sur le rectangle = 9 cellules.

Figure 21: Scenedesmus observée sous un microscope optique avec autres microorganismes à G 100.

Figure 22 : Photographie de l'espèce *Chlorella sp* observée au microscope optique G 100

Figure 23: Photographie de l'espèce *Scenedesmus sp* et autres espèces observées au microscope optique G100.

Figure 24 : Courbe de croissance de *Chlorella sp* en fonction du temps.

Liste des Tableaux

Tableau 1: Composition des micro-algues (*Scenedesmus sp*, *Spirulina sp*, *Chlorella sp*).

Tableau 2 : Répartition du fractionnement biochimique d'une cellule de micro-algue.

Tableau 3 : La concentration de *Chlorella sp* exprimée en nombre de cellules /ml ; en fonction de temps.

Tableau 4: Détermination du taux de croissance spécifique.

Introduction

L'Algérie possède un écosystème très diversifié pour cette raison, une importance flore aquatique se répartit sur les différentes zones humides du pays. Cette richesse floristique est constituée de différentes espèces végétales, parmi elles figurent les micro-algues.

Une telle diversité, non exploitée, constitue un réel potentiel pour la recherche et l'industrie. Les micro-algues sont des organismes microscopiques et photosynthétiques. Leur taille varie du micron à la centaine de microns. Elles se trouvent en abondance dans les milieux aquatiques (océans, rivières, lacs, etc.). Elles représentent le point de départ de la chaîne alimentaire et constituent de ce fait le premier maillon de la production primaire (Audineau, 1985).

Ces dernières années, la culture de micro-algues, plus particulièrement les espèces de la famille des Chlorophycées, a reçu beaucoup d'attention en raison de leur utilité dans divers domaines (aquaculture, pharmacie, alimentation humaine, énergie renouvelable.....etc.) (Borowitzka, 2011).

Le présent travail consiste en l'isolement de deux espèces de micro-algue d'eau douce à partir de la ferme de L'ENSSMAL (*Chlorella sp* et *Scenedesmus sp*) et le suivi de leur culture.

Ce travail est subdivisé en trois parties :

La première comporte une synthèse bibliographique ; divisée en trois chapitres : le premier renferme des généralités sur les micro-algues. Le deuxième chapitre décrit les espèces étudiées de la famille des chlorophycées. Le troisième chapitre est consacré à la culture des micro-algues dont les différents modes de culture et les principaux facteurs influençant la croissance de la biomasse. La seconde partie élucidera le protocole expérimental. Les résultats obtenus sont assemblés et discutés dans la troisième partie du document. Cette étude s'achève par une conclusion.

Partie 1

I-Généralités

1-Définition des algues

Les algues sont des organismes aquatiques primitifs dépourvus de racines, de tige et de feuilles, mais elles possèdent de la chlorophylle ainsi que d'autres pigments accessoires qui leur permettent de réaliser la photosynthèse et de produire de l'oxygène. Les algues sont classées dans le groupe des thallophytes appartenant au règne végétal, cependant certaines espèces phytoplanctoniques sont classées dans le règne des protistes qui regroupe les eucaryotes unicellulaires. La taille des algues peut varier de la cellule microscopique unique, à quelques cellules en colonie et jusqu'à 75 m (laminaires, sargasses) pour certaines formes multicellulaires (Cavalla, 2000).

2-Définition des micro-algues

Les micro-algues, ou algues microscopiques ou encore phytoplancton, ont généralement une taille de l'ordre du micron. Ce sont des organismes qui jouent un rôle primordial aussi bien dans les eaux douces, qu'en milieu marin, car elles constituent le 1^{er} maillon de la chaîne trophique, dont l'établissement conditionne l'équilibre biologique aquatique (Demoulin *et al.*, 2009). Elles sont importantes pour la vie sur terre, elles produisent environ la moitié de l'oxygène atmosphérique (Thurman, 1997). En milieu aquatique leur présence est perçue lorsqu'elles prolifèrent au point de colorer la surface des eaux. Leur coloration est due à la coexistence, dans leurs cellules, de pigments variés dont le plus important est la chlorophylle sous ses trois formes (a, b, et c). Cette chlorophylle leur confère la capacité de synthétiser la matière organique nécessaire à leur développement et ça à partir des molécules simples comme le gaz carbonique et l'eau (Diouf, 2009).

3- Critères de classification des micro-algues

D'après Fogg (1953), les micro-algues sont classées selon plusieurs critères : leurs propriétés morphologiques, la nature de leur cycle de vie, la nature chimique des produits photosynthétiques de réserve (produit d'accumulation intracellulaire), et l'organisation de leurs membranes photosynthétiques ou leurs pigmentations (Carlsson *et al.*, 2007 ; Kherarba, 2013).

4-Différents groupes de micro algues

Il existe principalement deux grands groupes de micro-algues :

4-1-Les procaryotes

Représentés par une seule classe, qui est la classe des Cyanophytes.

4-1-1-Les Cyanophytes

Dénommées aussi cyanobactéries ou algues bleu-vert, ce sont le groupe le plus primitif des algues. Elles ont à la fois des caractéristiques bactériennes et des algues (Hoff *et al*, 2001). Ce sont des organismes procaryotes, ne possèdent ni noyau ni chloroplastes (Bourrelly, 1966). Elles se développent souvent simultanément pour constituer soit des colonies visibles à l'œil nu soit des populations très importantes formant des "fleurs d'eau" exploitées depuis longtemps dans certaines régions comme les spirulines au Tchad ou au Mexique.

Les pigments présents dans la cellule sont nombreux : chlorophylle verte a et c, phycocyanine bleu-vert, phycoérythrine rouge et pigments d'accompagnement, bêta carotène et xanthophylles jaunes ou ochracés. Certaines espèces ne possèdent que de la chlorophylle. Ces pigments ne sont pas portés par des plastes mais sont diffus dans le cytoplasme et donnent aux cellules une coloration homogène. Le mélange de ces pigments dans le cytoplasme donne en général la teinte bleu-vert caractéristique des Cyanophycées (Ilits, 1980). Les Cyanophytes ne possèdent pas de formes flagellées. C'est un groupe d'algues très abondant dans les eaux douces africaines (Mis, 1980).

4.2-Les eucaryotes

Se dit d'un organisme dont le noyau cellulaire est séparé du cytoplasme par une membrane. Les micro-algues eucaryotes se divisent en 6 classes.

4.2.1-Les Chlorophytes

Dans cette classe on compte plus de 6'500 espèces, Ce sont les algues les plus consommées dont la laitue de mer, la nori ou l'ulve (Demoulin *et al*, 2009).

Ce groupe considéré comme le plus évolué des algues. Les chlorophytes ne se trouvent que très rarement au-dessous de 25 mètres de profondeur. Comme les végétaux supérieurs, elles sont caractérisées par la dominance de la 'Chlorophylle a et b', les algues appartenant à ce groupe sont de formes très variées (Lardière, 2004).

4.2.2-Les Rhodophytes

Elles Sont le plus souvent des algues marines et leur présence dans les eaux douces se limite à une trentaine de genres peu fréquents. Leurs pigments sont constitués par des chlorophylles a et d, des alphas et bêta carotènes, des xanthophylles et des biliprotéines (Phycoérythrine et Phycocyanine). Les réserves sont constituées de rhodamylon ou amidon floridéen, (amidon particulier toujours extraplastidial prenant une teinte rougeâtre au contact de l'iode), il n'existe pas de formes flagellées (Iltis, 1980). Ce sont des algues annuelles avec 3'500 espèces, dont les plus consommées sont les algues dulse, nori ou carraghénanes (Demoulin, 2009).

4.2.3-Les Cormophytes.

Elles se caractérisent par la présence des chromatophores bruns, jaunes, ou vert-jaunâtres (Iltis, 1980). Ce sont des algues qui peuvent atteindre 50 mètres de long ; les plus connues sont les algues wakamé, kombu, armé ou spaghetti de mer. Elles sont regroupées dans trois classes. Les algues brunes sont caractérisées par la dominance de la 'Fucoxanthine' qui donne la couleur jaune olive à jaune pâle (Lardière, 2004). Elles ne possèdent jamais d'amidon et ne se colorent pas au contact de l'iode (Iltis, 1980). Elles montrent une grande diversité morphologique, on compte plus de 2 000 espèces dont la grande majorité est exclusivement marine (Lardière, 2004).

4.2.4-Les Euglénophytes

Elles sont à la fois proches des algues brunes et des protozoaires.

Certaines espèces ont des plastes, mais ne fabriquent jamais d'amidon, mais une autre forme de réserves glucidiques, le paramylon. Certaines espèces sont apigmentées et se nourrissent de substances organiques dissoutes. Certaines espèces établissent des relations symbiotiques avec des chlorelles. Ces relations sont plus ou moins durables.

Les chlorelles, contenues dans des vacuoles, font de la photosynthèse, à la mauvaise saison si la lumière est trop faible, l'euglène se nourrit par phagocytose comme un protozoaire.

Si les conditions deviennent très difficiles certaines euglènes perdent leurs flagelles, se chargent de réserves, s'arrondissent et s'entourent d'une enveloppe protectrice qui leur permet d'attendre de meilleures conditions (www.ecosociosystemes.fr).

4.2.5-Les Phéophytes

Ce sont des algues brunes toujours filamenteuses ou thalloïdes, jamais unicellulaires. Elles sont surtout marines et ne sont représentées en eaux douces que par cinq genres et cinq à six espèces très rares. Elles possèdent des plastes bruns contenant des chlorophylles (a et c), du bêta carotène et des xanthophylles (surtout de la fucoxanthine et de la diatoxanthine). Elles ne produisent jamais de l'amidon et les matières de réserve consistent en laminarine et en mannitol (Durand *et al.*, 1980).

4.2.6-Les Pyrophytes

Elles possèdent des plastes bruns plus rarement rouges ou bleu-vert contenant des chlorophylles a et c, du carotène et parfois des biliprotéines. Les formes unicellulaires biflagellées sont très nombreuses. Les réserves sont constituées par de l'amidon extraplastidial (Ilits, 1980).

5- Domaines d'utilisation des micro-algues

Il est possible de décomposer l'utilisation des micro-algues dans l'industrie en trois parties : la production de biomasse à but alimentaire, la production de molécules spécifiques dites à haute valeur ajoutée et les applications environnementales (Giuliana *et al.*, 2009).

- Dans l'industrie agro-alimentaire : l'extraction et la fabrication de pigments naturels utilisés pour l'alimentation humaine et animale. Le bêta carotène est un pigment synthétisé par l'algue *Dunaliella* et utilisé comme colorant en industrie alimentaire, d'autres caroténoïdes, tel que l'astaxanthine synthétisé par l'algue *Haematococcus* (Becker, 2004), la lutéine, zéaxanthine et canthaxanthine sont des antioxydants (Gouveia *et al.*, 2007).

- En médecine et en industrie pharmaceutique : utilisation thérapeutique, allopathique ou homéopathique et dans la production de produits cosmétiques (Chader, 2003).
- Les micro-algues apparaissent également comme de bons fertilisants des sols pauvres puisqu'elles apportent notamment du potassium, de l'azote et d'éléments essentiels à la croissance végétale (Chader, 2003).
- Elles peuvent également servir à l'épuration des eaux résiduelles urbaines (bio remédiation), notamment dans les pays en voie de développement (Cavalla, 2000).
- Les micro-algues peuvent être directement impliquées dans la production d'énergie nouvelle et renouvelable notamment la production d'hydrocarbures et de biocombustibles (Chader, 2003). Certaines micro-algues ont la capacité de produire de l'hydrogène grâce à des enzymes, les hydrogénases, lors de la photosynthèse, cet hydrogène peut être utilisé comme biocombustible et ainsi servir de source d'énergie propre et renouvelable.

Les possibilités d'utilisation des micro-algues sont donc nombreuses et variées, en plus de la production d'algo-carburants, des recherches sont en cours notamment sur les pigments dans la lutte contre le cancer (Cadoret, 2008).

5-1 Utilisation en aquaculture

Les micro-algues, premier maillon de la chaîne alimentaire, constituent la nourriture du zooplancton filtreur qui sert comme proies aux larves des espèces de poissons élevées en éclosion pendant les premiers stades de développement (Barnabé, 1989). Selon Blackwell (2013), les micro-algues constituent une source essentielle de nourriture pour toutes les étapes d'élevage de mollusques bivalves marins, ainsi que les premiers stades larvaires de certains gastéropodes marins (ormeau, coquille de conque) et les larves de plusieurs espèces de poissons marins et continentaux et des crevettes pénéidés.

Les micro-algues fournissent des pigments essentiels tels que l'astaxanthine, la zéaxanthine, la chlorophylle et la phycocyanine qui améliorent la coloration et la santé des poissons et d'invertébrés, Elles ont un effet thérapeutique comme antibiotiques sur les poissons et les autres animaux (Hoff *et al.*, 2001).

6- Mode de nutrition

Les micro-algues ont une physiologie souple qui leur permet de s'alimenter selon différents modes ; en principe on distingue trois modes de nutrition :

6-1 L'autotrophie

Les organismes autotrophes sont capables de synthétiser leur propre matière organique à partir d'une source d'énergie 'la lumière'. Lorsqu'on parle de culture autotrophe chez les micro-algues, on parle d'une culture qui se développe avec un apport de lumière, de CO₂ et de certains éléments minéraux. Cette culture produira son énergie grâce à la lumière et réalisera la photosynthèse (Salomez, 2009). Les éléments minéraux absorbés sont l'azote (NH₄⁺, NO₂⁻, NO₃⁻), mais reste l'ammoniac la forme préférentielle utilisée par de nombreuses micro-algues (Capblancq, 1982 ; Dabbadie, 1992).

L'autotrophie permet aux micro-algues d'utiliser l'énergie des rayons solaires afin de synthétiser leur énergie. Les micro-algues à métabolisme autotrophe utilisent également une source de carbone inorganique comme le CO₂ et le HCO₃⁻ pour la synthèse du carbone organique (Stevenson *et al.*, 1996).

6-2. Hétérotrophie

Les organismes hétérotrophes, à l'inverse, ne sont pas capables de synthétiser leur propre matière organique et les prélèvent plutôt du milieu externe. Ils sont donc dépendant des organismes autotrophes (Salomez, 2009).

Ce mode de nutrition permet l'assimilation directe des substances organiques, de façon plus ou moins indépendante de la photosynthèse. La croissance algale à l'obscurité, sur des milieux contenant des matières organiques, est connue depuis longtemps (Dangeard, 1921). Les algues sont en effet capables d'utiliser et d'assimiler des substances organiques dissoutes (Droop, 1974) et même particulières par phagotrophie (Porter, 1988 ; Dabbadie, 1992).

6-3 Mixotrophie

Les mixotrophes sont capables de tirer leur énergie d'une source carbonée mais également du soleil via la photosynthèse, Ils ont un besoin de carbone organique pour croître à la lumière, vraisemblablement en raison d'une incapacité d'assimiler le CO₂ à la lumière (Salomez, 2009).

Certaines espèces de *Scenedesmus* et de *Chlorella* sont hétérotrophes vis-à-vis du glucose. En revanche, d'autres algues ont besoin de lumière de façon plus ou moins stricte (photo hétérotrophie), ou d'un milieu oxygéné (hétérotrophie aérobie) pour utiliser la matière organique (Wiedeman, 1970 ; kherarba 2013) à l'exemple de *Scenedesmus quadricauda* (Maejo *et al.*, 2014 ; In Dabbadie,1992) et de *Chlorella ellipsoidea* (Zajic *et al.*, 1970 ; In Dabbadie, 1992).

7-Reproduction des micro-algues

Chez les micro-algues on distingue deux types de reproduction ; sexuée et asexuée.

7-1-Reproduction asexuée

Dans la reproduction asexuée on distingue trois types :

-La fragmentation: le thalle se sépare en deux phases qui redonneront chacune un nouveau thalle.

-La sporulation: des spores peuvent être formées dans les cellules végétatives ordinaires ou dans des structures spécialisées appelées sporanges.

-La scission binaire : Se fait pour la division du noyau puis du cytoplasme.

7-2-Reproduction sexuée

Ce mode de reproduction repose sur la fusion de gamètes mâles et femelles pour produire un zygote diploïde (Cavalla ,2000).

8-Composition biochimique

Tableau 1: Composition des micro-algues (*Scenedesmus sp.*, *Spirulina sp.* et *Chlorella sp.*).

Espèces			
Composition en % du poids sec:	<i>Scenedesmus sp.</i>	<i>Spirulina sp.</i>	<i>Chlorella sp.</i>
Protéines brutes	50-60	50-62	55,5
Eau	4-8	4-10	7
Lipides	12-14	2-7	7,5
Glucides	10-17	16-18	17,8
Fibres brutes	3-10	0,1 -0,9	3,1
Cendres	6-10	6,4 -9,0	8,25
Acides aminés (en g/16 g N):			
Valine	6,2 -7,2	6,5	5,1
Leucine	6,6- 9,3	8,5	4
Isoleucine	3,2-4,4	6	3,4
Thréonine	4,8-5,8	4,6	3,2
Méthionine	1,4-1,5	1,4	1,8
Phénylalanine	3,6-4,6	5	4,5
Tryptophane	1,2-1,4	1,4	1,4
Lysine	5,0-5,7	4,6	7,8
Vitamines et autres (en mg/100 g MS):			
Acide ascorbique (C)	40	-	1,5
carotène	50	150	50,2
Acide panthoténique	1,2	360	1,12
Pyridoxine (B6)	-	3	0,3
Thiamine (B1)	0,17	5,5	0,77
Riboflavine (B2)	0,42	4	-

Source : (Lubitz, 1961 ; Soeder *et al.*, 1970 ; de la Noüe *et al.*, 1986; Fox, 1986; In Dabbadie, 1992).

Le fractionnement biochimique se répartit suivant quatre familles de molécules : protéines, lipides, sucres et acides nucléiques (Tableau 2). Cette composition dépend des espèces et des conditions de culture.

Tableau 2 : Répartition du fractionnement biochimique d'une cellule de micro-algue.

Compartiment biochimique	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

Source : (Sialve *et al.*, 2013).

Les micro-algues sont riches en protéines, toute fois le profil des acides aminés indique une déficience en méthionine et en acides aminés soufrés. Ceci a été souligné par (Plaud, 1936 ; Noué *et al.*, 1986). En revanche ces micro-algues sont riches en vitamines, en substances économiquement intéressantes : acide gras polyinsaturés (Noué *et al.*, 1990).

La composition chimique peut être modifiée en fonction du milieu de culture, du mode de culture et des moyens de préservation. Les micro-algues présentent une très grande diversité de molécules au sein de leurs cellules. Cette biomasse se différencie principalement des autres végétaux par sa richesse en lipides, en protéines, en vitamines, en pigments et en antioxydants. Elles représentent une source importante de vitamines essentielles : B1, B6, B12, C, E, K1 (voir annexe), et possèdent un large panel de pigments en plus de la chlorophylle qui est le pigment photosynthétique primaire chez toutes les algues photosynthétiques, on trouve ainsi toute une gamme de pigments supplémentaires de type caroténoïdes et phycobiliprotéines (phycoérythrine et phycocyanine). Les pigments principalement exploités sont la phycocyanine de la spiruline (colorant bleu), la phycoérythrine (couleur rouge) de *Porphyridium purpureum*, l'astaxanthine d'*Haematococcus pluvialis* ou le bêta-carotènes de *Dunaliella salina* (Person, 2010).

9-Critères de sélection

Les micro-algues sont sélectionnées selon deux critères : valeur alimentaire et facilité de culture. Il entre en compte ainsi la dimension des cellules, la nature des parois cellulaires et la composition chimique elle-même (Barnabé, 1989).

II-Présentation des micro-algues utilisées

Parmi les espèces d'algues autochtones riches en protéines et en acides gras essentiels, à intérêt agroalimentaire, nous citerons tout particulièrement les spirulines : algue halotolérante extrême du groupe des Cyanobactéries et deux Chlorophytes : *Chlorella* et *Scenedesmus* (Chader *et al*, 2001). Notre étude a portée sur ces deux dernières espèces de micro-algue d'eau douce ; *Chlorella sp* et *Scenedesmus sp*.

a) *Chlorella sp*

1-Présentation

La Chlorelle est une algue verte unicellulaire d'eau douce se distingue des autres végétaux par une exceptionnelle concentration en chlorophylle (Salomez, 2009).

Les chlorelles sont des cellules de petites taille, leur diamètre varie de quelques microns à 20 microns .au maximum, toujours solitaire, de forme sphérique ou ellipsoïdale, plus rarement réniformes ou asymétriques, à membrane distincte, avec 1 ou rarement 2 plastes, parfois un pyrénnoïde (Bourelly, 1966).

La culture est très ancienne, mise en évidence par Beijerinck en 1981 en milieu axénique (Soéderet *al*, 1970) en raison de sa croissance rapide, elle est utilisée comme model en laboratoire par les physiologistes.

La culture intensive de la chlorelle a eu lieu après la seconde guerre mondiale en Allemagne pour combler le manque en protéines (Vonwitsch, 1970).

2-Systématique

Embranchement : Chlorophytes

Classe : Chlorophycées

Ordre : Chlorococcales

Famille : Oocystaceae

Genre : *Chlorella*

Espèces: *Chlorella Vulgaris* ,*ovalis*, *salina*, *antarctica*



Figure 1: *Chlorella vulgaris* (www.aquaportail.com)

3-Composition

La chlorelle contient tous les acides aminés essentiels importants, des lipides et des minéraux avec une dominance des protéines de l'ordre de 55.5 % de leur poids totale (Lubitz *et al.*, 1961; Dabbadie, 1992).

4-Reproduction

Chez *Chlorella sp*, la reproduction se fait par l'auto-sporulation. La multiplication se fait par 2, 4, 8, 16 autospores libérées par rupture de la membrane maternelle (Bourrelly, 1966).

5-Domaine d'utilisation

-1969 emploi de Chlorelle pour traitement des effluants agricoles et domestiques : travaux de Oswald *et al.*, cité par Gabduar (1979).

- 1980 culture en station orbitale envisagé par la NASA (Soeder *et al.*, 1970).

- Culture en sous-marin à propulsion nucléaire (Fox, 1986) pour un double objectif : alimentaire et de régénération de l'air ambiant.

La Chlorelle est produite comme aliment de santé pour les humains et les animaux en Allemagne, Japon, Chine et plusieurs autres pays Asiatiques, elle est aussi utilisée dans la fabrication de molécules chimiques tels que les caroténoïdes, les protéines recombinant (Blackwell, 2013). Aujourd'hui, elle constitue un complément alimentaire vendu en magasin diététique. Elle possède également de bonnes vertus détoxifiantes, et de fixation des métaux lourds (Salomez, 2009).

6-Mode de nutrition

Chlorella sp est une espèce hétérotrophe prélève sa matière organique (D.glucose-acétate) de l'extérieur (Neilson *et al*, 1974, Dabbadie, 1992).

b) *Scenedesmus sp*

1-Présentation

Le genre *Scenedesmus* est une algue unicellulaire ; elle comporte un nombre important d'espèces d'algues unicellulaires qui sont réparties en 4 sections suivant la morphologie des cellules et leur ornementation (Bourrelly, 1966 ; Ittis, 1980). C'est une micro-algue verte non mobile qui comprend des cénobes de 4 à 8 cellules ellipsoïdales ou fusiformes alignées côte à côte, leurs grands axes étant parallèles.

Les cellules sont souvent ornementées d'épines, d'aiguillons et de pores. Les cellules marginales du cénobe ayant souvent une ornementation différente de celles du centre. Chaque cellule présente un plaste portant un pyrénoloïde bien visible (Bourrelly, 1966).

Sa culture est très ancienne. Toutefois la culture intensive est apparue après la guerre mondiale (Soeder *et al.*, 1970). Elle a été cultivée sur des déchets organiques (De Pauw *et al.*, 1980).

2-Systematique

Embranchement: Chlorophyte

Classe : Chlorophycées

Ordre: Chlorococcales

Famille : Scenedesmaceae

Genre : *Scenedesmus*

Especies : *Scenedesmus parisiensis*, *Scenedesmus parvus*,



Figure 2 : *Scenedesmus sp* (Kojima *et al.*, 1995)

3- Composition

La micro-algue *Scenedesmus* contient une quantité importante de protéines plus de 50% de leur poids totale avec presque tous les acides aminés essentiels ; elle contient également des lipides et des minéraux (Lubitz *et al.*, 1961 ; Dabbadie, 1992).

4- Reproduction : Certaines espèces de *Scenedesmus* se reproduisent selon le mode asexué ; elles se divisent par scission binaire (division du noyau puis du cytoplasme) (Cavalla, 2000).

5- Domaine d'utilisation

Selon Kim *et al* (2007), *Scenedesmus*, est utilisée dans l'alimentation des poissons, la nourriture humaine et la production des produits pharmaceutiques, elle est également utilisée comme agent bioremediateur dans l'élimination des substances nutritives inorganiques de l'eau polluée.

6- Mode de nutrition

Scenedesmus est une espèce hétérotrophe prélève sa matière organique de l'extérieur par exemple : acétamide, acide urique, adénosine, alanine (Neilson *et al.*, 1980 ; Dabbadie, 1992).

III-Culture des micro-algues

La culture de micro-algues est l'une des biotechnologies modernes. Les premières cultures unialgales ont été atteintes par Beijerinck en 1890 avec *Chlorella vulgaris*. L'utilisation de ces cultures pour l'étude de la physiologie des plantes a été développée par Warburg dans le début des années 1900. La culture de masse de micro-algues a vraiment commencé à être l'objet de recherches depuis 1948 à Stanford (USA), Essen (Allemagne) et Tokyo. Le livre classique édité par Burlew (1953), résume beaucoup de ces premières études (Borowitzka, 2011).

1- Les systèmes de production

Les systèmes de production de micro-algues sont de natures très variées, depuis les bassins à ciel ouvert, jusqu'aux photos bioréacteurs clos.

Tous ces systèmes diffèrent par de nombreux aspects portant notamment sur leur géométrie, les conditions de culture des algues, la lumière, le mélange, le contrôle thermique, les transferts de gaz, et les conditions d'exploitation.

Les cultures à surface libre en bassins, plans inclinés ne sont possibles que pour une poignée d'espèces dominantes ou extrêmophiles parmi lesquelles, *Chlorella sp.*, *Scenedesmus sp.*. Les autres espèces nécessitent des précautions destinées à accroître les chances de développement de l'algue choisie par un renforcement général de l'asepsie des cultures, par une inoculation massive, et pour des cultures de courte durée (batch) (Vincent *et al.*, 2004).



Figure 3 : Système de culture de type raceway (www.ifremer.fr).

Ces bassins sont les plus utilisés car ils permettent d'obtenir les rendements les plus importants. L'investissement qu'ils représentent et le besoin en main d'œuvre qualifiée est moins important que pour les autres technologies de type photo bioréacteurs. Cependant, les bassins de type « raceway » présentent des inconvénients ; étant à ciel ouvert, il est difficile de contrôler les différents paramètres de culture. De plus, ces systèmes sont sensibles à la contamination, soit par des espèces locales qui vont se développer et remplacer l'espèce cultivée (bactéries), soit par des prédateurs (crustacés, ...). Pour éviter ces problèmes, seules des espèces poussant dans des milieux alcalins (comme la spiruline) ou hyper salins (*Dunaliella salina*) sont cultivées en plein air (Cadoret *et al.*, 2008).

1-1-Définition d'un bioréacteur

Il s'agit d'un espace contrôlé contenant des organismes vivants qui interagissent avec différents substrats. En suivant cette définition, nous pouvons trouver les dispositifs de laboratoire (le plus souvent des cultures pures), les bassins artificiels, mais aussi les écosystèmes naturels (lacs ou lagunes).

Ces systèmes sont composés de microorganismes, des substrats nécessaires pour leur croissance (C, N, K, Na, Fe,...), des catalyseurs pour démarrer ou accélérer une réaction et des produits synthétisés par ces microorganismes.

Les photo-bioréacteurs se différencient des bioréacteurs classiques par la nécessité de fournir un substrat additionnel (lumière) en plus de conditions générales de culture (Giuliana, 2009).

Le photo bioréacteur le plus simple et le plus répandu dans les écloséries d'aquaculture est un tube vertical à la base duquel est injecté de l'air et recevant de la lumière à travers ses parois transparentes. Des tubes fluorescents sont souvent disposés autour de ces volumes selon un ratio puissance / volume de l'ordre de 1 Watt par litre de culture (Vincent *et al.*, 2004).

En terme de fonctionnement, les réacteurs peuvent soit fonctionner en mode continu ou en discontinu. De manière générale, les réacteurs fonctionnent en continu, c'est à dire qu'ils sont alimentés en permanence avec du milieu frais, tandis qu'une certaine quantité de biomasse produite est soutirée avec le même débit (pour garder le volume du réacteur constant). Théoriquement, aucune concentration ne varie au cours du temps dans le réacteur.

Dans le cas d'un réacteur fonctionnant en discontinu il faut alors mettre au départ une quantité de nutriments définie dans le milieu de culture ainsi qu'une certaine quantité de micro-algues que l'on va laisser se multiplier (leur concentration augmente dans le temps tandis que les concentrations en nutriments diminuent) jusqu'à ce qu'elles atteignent une phase stationnaire de croissance, qui témoigne de l'épuisement du milieu en éléments nutritifs. Le réacteur est finalement vidangé et nettoyé avant de démarrer un nouveau cycle. Cadoret (2008), rapporte que les rendements sont cinq fois plus importants en continu qu'en discontinu ; en raison de leur robustesse, leurs qualités optiques et hydrauliques, leur coût, leur facilité de mise en œuvre, et du contrôle poussé des conditions de culture qu'ils autorisent, les photo-bioréacteurs tubulaires sont choisis le plus souvent pour les installations industrielles (Vincent *et al.*, 2004).

Le principal avantage de cette technique est qu'elle permet de contrôler les conditions de culture (distribution et évacuation du CO₂, de l'O₂, contrôle du pH, de la température,...), et aussi de maintenir la stérilité de la culture (Cadoret *et al.*, 2008).

Ces systèmes présentent plusieurs inconvénients. En effet, l'accumulation d'O₂, des déchets de la photosynthèse, peuvent rendre le milieu toxique, du fait de l'augmentation de pH qui en résulte.

Les rayonnements UV passant à travers les parois transparentes des réacteurs, ainsi que l'élévation de température, peuvent également être fatals. De plus, il est nécessaire d'avoir un système d'agitation par pompe, hélice, turbine, bullage magnétique, ou par circulation forcée afin de limiter les dépôts de la biomasse sur la paroi du bioréacteur (ce qui a pour conséquence de diminuer la productivité).

Enfin, ces techniques sont plus évoluées et donc leur coût de revient est beaucoup plus élevé que les cultures en bassin (Cadoret *et al.*, 2008).

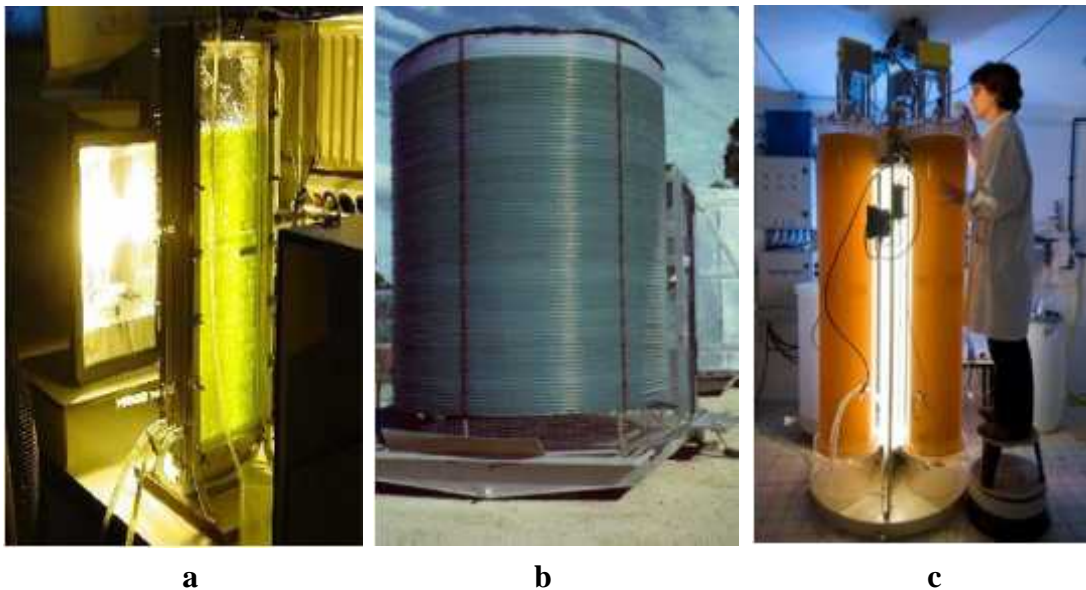


Figure 4 : Photo bioréacteur plats(a), tubulaires(b), en colonnes(c) (Cadoret *et al.*, 2008).

2-Les conditions de culture des micro-algues

La croissance d'une culture de micro-algues est contrôlée par un très grand nombre de paramètres dont les plus importants sont la lumière le pH, les nutriments, les concentrations en CO₂ et O₂ et l'état physiologique.

2-1-Les conditions physiques

2-1-1 La lumière

Représente la source d'énergie qui concerne l'intensité, la qualité spectrale et la photopériode qui doivent être contrôlées. L'intensité lumineuse joue un rôle important, mais les exigences varient avec la profondeur et la densité de la culture d'algues : lorsque les concentrations cellulaires sont importantes à des profondeurs supérieures, l'intensité lumineuse doit être augmenté pour pénétrer à travers la culture (Kherarba, 2013).

Les cultures reçoivent une lumière blanche artificielle diffusée par des tubes fluorescents d'une puissance de 40 à 60 Watts. Les tubes sont placés horizontalement pour que la lumière diffuse plus largement autour des chémostats. L'ensemble des espèces cultivées nécessite une intensité lumineuse de 3500 à 5000 lux L'énergie lumineuse est fournie 24 heures sur 24 pour maximiser la production photosynthétique (Audineau *et al.*, 1986).

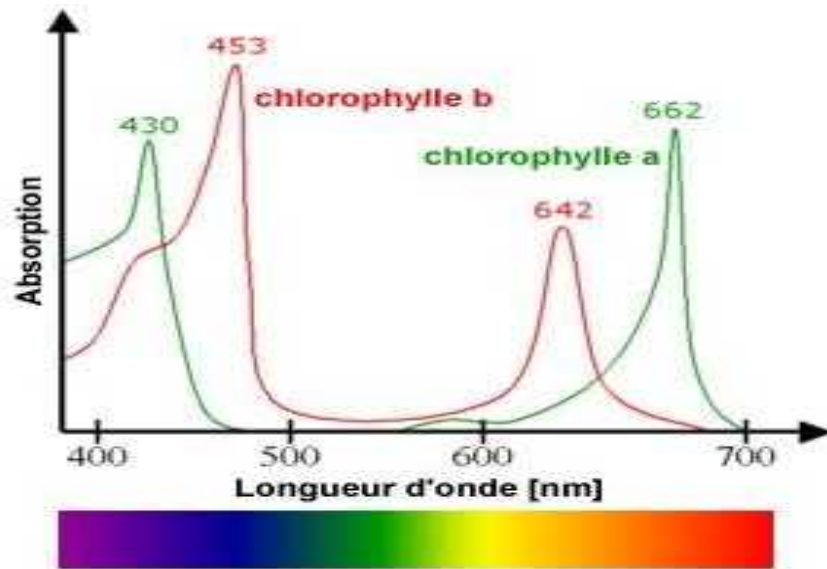


Figure 5 : Les longueurs d'ondes permettant le développement de la micro-algue (www.algue-production-energie.e-monsite.com).

La micro-algue a besoin de lumière pour vivre. Ce facteur physique est très important. Plus la culture est exposée à la lumière et plus les conditions de cultures seront optimales. De plus, les régions les plus ensoleillées seront les plus efficaces pour cultiver des micro-algues. Une lumière artificielle peut aussi être utilisée ; mais il faut que celle-ci émette à des longueurs d'ondes précises comme celle dans le rouge et celle dans le violet et le bleu. En effet ce sont celles que les algues utiliseront pour la photosynthèse.

Cependant l'exposition à la lumière doit quand même être régulée car l'excès de lumière peut entraîner une photo inhibition c'est-à-dire la diminution de la vitesse de photosynthèse, ce qui peut être nuisible à la production.

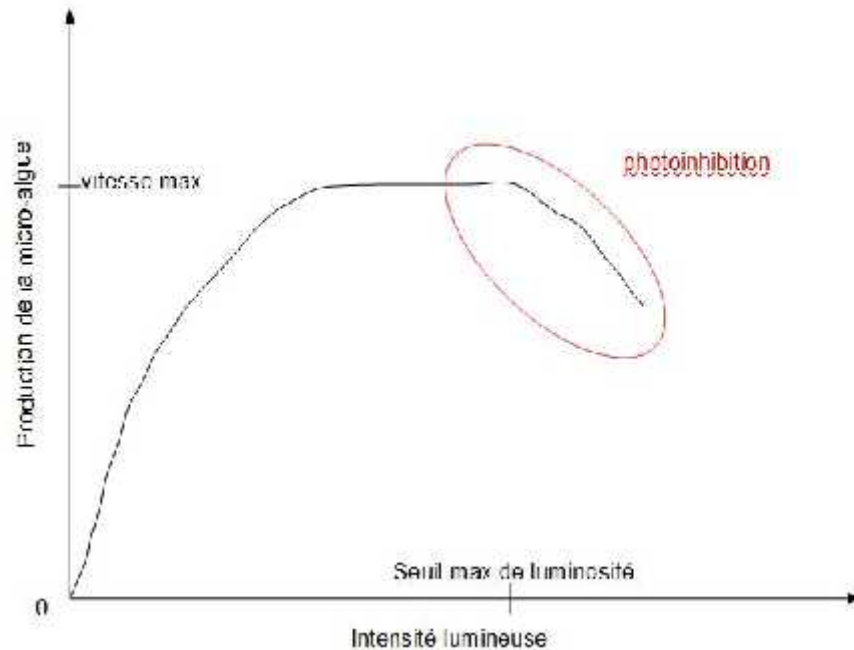


Figure 6 : Développement de la micro-algue en fonction de l'intensité lumineuse.

(www.algae-production-energie.e-monsite.com).

La lame d'eau peut régler ce problème ou tout simplement, un simple ombrage. Un ombrage partiel, qui laisse quand même passer un peu de lumière, avec l'accumulation des particules dans le bassin de culture, la micro-algue crée elle-même un auto-ombrage. Il faut donc s'assurer d'avoir une luminosité optimale pour parfaire la culture.

2-1-2-La température

La température optimale pour la culture des micro-algues est en générale comprise entre 20 et 24°C, bien que cela puisse varier en fonction de la composition du milieu de culture, de l'espèce et de la souche cultivée. Les espèces les plus couramment cultivées de micro algues tolèrent des températures entre 16 et 27°C (Lavens *et al.*, 1996).

2-1-3-La salinité

Certaines micro-algues poussent plus facilement à des salinités inférieures à celles de l'eau de mer. De ce fait, une dilution avec de l'eau douce permet d'atteindre une salinité de 20 au lieu de 35 ‰ (Barnabé, 1989).

2-1-4-L'agitation

La plupart des cultures ont tendance à se sédimenter. Il est donc nécessaire de les agiter quotidiennement manuellement lorsqu'il s'agit des petits volumes de 1 ou 2 litres, tandis que pour des volumes plus importants, on fait appel à l'agitation par bullage d'air, qui a l'avantage d'apporter du gaz carbonique (Barnabé, 1989).

2-2 Les conditions chimiques

2-2-1-Les sels minéraux

Pour obtenir les concentrations optimales en phytoplancton destiné à la nutrition des animaux, les sels nutritifs présents dans le milieu naturel sont insuffisants. Il est donc impératif d'enrichir le milieu de culture en éléments nitrates, phosphates, métaux, oligo-éléments et vitamines. Dans le cas des diatomées, il faut ajouter de la silice pour la constitution de leur paroi cellulaire (Audineau *et al.*, 1986).

2-2-2- Le pH:

Selon Lavens *et al* (1996), la valeur du pH pour les espèces de micro-algues les plus cultivées se situe entre 7 et 9, avec un optimum de 8,2 - 8,7.

La perturbation de nombreux processus cellulaires peut résulter d'un défaut de maintien de la valeur de pH acceptable. Dans le cas de la culture d'algues de haute densité, l'addition de dioxyde de carbone permet d'ajuster le pH, qui peut atteindre des valeurs de limitation jusqu'à PH 9 pendant la phase de croissance d'algues.

2-2-3-Le Gaz carbonique (aération)

Le gaz carbonique apporté par l'air du bullage ne suffit plus ; Il est souhaitable d'ajouter un appoint en gaz carbonique (par exemple 1 % du volume d'air). Toutefois, suivant l'âge de la culture, le réglage du débit de gaz carbonique est parfois délicat ; il y a un risque de production de métabolites toxiques par des cultures à très haute densité (Audineau *et al.*, 1986).

3-Les techniques de culture des micro-algues

La culture des micro-algues passe par plusieurs étapes :

3-1-La préparation de la souche

3-1-1L'isolement

L'isolement des cellules permet d'obtenir des cultures mono spécifiques. Il est conseillé d'utiliser des cultures en phase de croissance exponentielle c'est-à-dire composées de cellules jeunes ayant un bon potentiel de multiplication (Bechagra, 1996). Le choix des algues dans le milieu naturel est déterminant. Une mise en culture préalable peut augmenter la concentration des cellules et améliorer leur qualité. Trois méthodes d'isolement sont généralement en milieu solide ou en milieu liquide ou isolement par dilution (Blancheton, 1985-1986).

3-1-2 L'isolement en milieu liquide

Cette méthode convient principalement aux cellules assez grosses, ou en chaîne. Les cellules doivent être diluées dans l'eau de mer stérile et placées sous la loupe binoculaire. A l'aide d'une fine pipette pasteur ces micro-algues sont prélevées une par une et introduites dans un tube à essai contenant le milieu de culture. Une stérilisation de la souche sera effectuée ultérieurement par un traitement antibiotique (Le Borgne, 1973).

3-1-3 L'isolement en milieu solide

On utilise des boîtes de pétri remplies de gélose et enrichies en milieu de culture (Audineau, 1986). On étale ensuite sur la gélose, à l'aide d'une anse de platine, dès que le premier développement apparaît, on prélève à nouveau quelques cellules qu'on étale sur une nouvelle boîte de pétri. L'opération peut être reproduite plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'un développement d'algue mono-spécifique qui sera mise en culture dans un milieu liquide (Pincemin, 1971 ; Fiala, 1978).

3-2-La purification des cultures

Quand les cultures unialgales sont développées, on cherche ensuite à éliminer les bactéries pour les rendre axéniques, pour cela, on peut les laver par migration dans un milieu contenant des antibiotiques introduites à une extrémité d'un tube éclairé seulement à l'autre extrémité, les cellules des algues mobiles vont être attirées par la lumière (Barnabé ,1989). Des cultures sur milieux solides contenant des antibiotiques (pénicilline G, streptomycine sulfate, chloramphénicol) peuvent servir également à obtenir des colonies algales débarrassées des bactéries (Le Borgne, 1986).

3-3- Les cultures mères

Une collection de cultures mères est un bien précieux et vital pour le fonctionnement de l'ensemble de la production. Les pertes par contamination (mauvaise manipulation) ou accident (mauvaise régulation thermique, erreur dans la préparation du milieu) sont donc à redouter : pour diminuer les risques, il est souhaitable de conserver deux séries de souches, l'une servant à la production, l'autre ne subissant que les manipulations nécessaires à son entretien et n'étant utilisée qu'en cas de défaillance de la souche de production. Des contrôles périodiques au microscope permettent de vérifier qu'il n'y a pas eu contamination d'une espèce algale par une autre, lors des manipulations (Barnabé, 1989).

3-4-Le contrôle du développement algal

Il existe plusieurs moyens d'évaluation de la quantité de micro-algues présentées dans les cultures, soit par comptage du nombre de cellules, soit par leur volume, leur coloration, leur poids.

3-4-1-Les numérations

On peut utiliser un compteur de particules ou compteur au microscope à l'aide d'un hémacytomètre. Dans ce dernier cas, une goutte est introduite par capillarité entre la lame de l'hémacytomètre et la lamelle couvre-objet.

Les cellules comptées sur 1 mm² de surface correspondront à 0,1 mm³ de culture. Dans le cas de cellules mobiles, il faut fixer l'échantillon par du formol ou des cristaux d'iode. Le comptage au microscope a l'avantage de permettre un contrôle de l'état des cultures, mais il ne tient pas compte de la dimension de chaque cellule, qui peut varier de façon très importante.

3-4-2-Le volume cellulaire

On fait passer les échantillons dans une centrifugeuse et on mesure le volume du culot, la mesure est facilitée si le fond des bols de centrifugation est long et étroit (Le Borgne, 1978).

3-4-3-La mesure du poids sec

Après centrifugation d'un volume assez important, on peut sécher l'échantillon au four. C'est une mesure précise pour comparer plusieurs cultures entre elles (Fiala, 1979) mais le processus est long et ne permet pas un diagnostic rapide (Jaque 1978).

3-4-4-La densité optique (dosage de chlorophylle)

Un spectrophotomètre mesure la pénétration de radiations d'une longueur d'onde donnée à travers un échantillon contenu dans une cuve en quartz. Cette méthode nécessite un appareillage relativement complexe, mais on peut établir une correspondance entre la densité optique et la concentration cellulaire une variante consiste à mesurer la teneur en chlorophylle (Neveux, *in* Jacques, 1978). Les teneurs en pigment de chaque cellule peuvent varier selon les conditions de culture (Barnabé, 1989).

3-4-5-Dosage des chlorophylles

Etant donné que les micro-algues contiennent de la chlorophylle, l'estimation de ce pigment est bien élaborée, méthode fiable pour le calcul de la biomasse algale.

Selon la souche des micro-algues examinée, les solvants comme l'acétone (80% ou 100 %) l'éthanol (Sartory 1982; Bekker, 1994) ou le diéthyléther (Bikker, 1994) sont utilisés pour extraire le pigment des cellules de micro-algues. Selon Stewart (1974) et Sartory (1982), le méthanol est aussi utilisé comme un solvant pour l'extraction des pigments à partir des micro-algues. Marker (1972), a trouvé que le méthanol est un meilleur solvant d'extraction des chlorophylles.

Les étapes suivantes sont recommandées pour la préparation de l'extrait de chlorophylle. En ne laissant que le culot qui contient les cellules micro-algues qui sont lavées avec de l'eau distillé et centrifugées une autre fois. Puis faire suspendre les cellules dans 4 ml de méthanol à 100%. Le tube est mis à l'obscurité, les cellules se détruisent et il ne reste que les plastes qui contiennent de la chlorophylle.

Dans certains cas, un bref chauffage est nécessaire pour réaliser l'extraction du pigment complet

Après que les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation ou filtration, l'extrait de pigment dans un spectrophotomètre (UV-visible) à des longueurs d'onde (470, 652.4 et 665.2 nm). La quantité des pigments est calculée selon les équations suivantes (Formule de Lichtenthaler, 1987)

$$[Ch_a] = 16.72 DO_{665.2} - 9.16 DO_{652.4}$$

$$[Ch_b] = 34.09 DO_{652.4} - 15.28 DO_{665.2}$$

$$[Ch_{a+b}] = 1.44 DO_{665.2} + 24.93 DO_{652.4}$$

$$\text{Caroténoïdes} = (1000 DO_{470} - 1,63 [Ch_a] - 104.96 [Ch_b]) / 221$$

4-La récolte

A la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de la croissance des micro-algues, la biomasse micro-algale doit être récupérée en utilisant deux techniques.

4-1-La centrifugation

Dans des conditions aseptiques et à côté du bec bunsen en utilisant des tubes à centrifugeuse stérile remplis avec de la culture, puis on centrifuge à 5000 tour pendant 15 min .Le milieu de culture est jeté en laissant que le culot qui contient des cellules micro-algales. Les étapes ont été répétées jusqu'à la fin de la biomasse. A la fin les culots ont été récupérés avec une pipette pasteur dans des boîtes pétri stériles et congelées à une température -4°C (Person, 2010).

4-2-La filtration

La filtration consiste à faire passer la culture parallèlement à la surface du filtre. C'est la pression de la pompe qui permet au milieu de culture de traverser le filtre. Les particules dans ce cas restent dans le papier filtre et le colmatage s'effectue ainsi beaucoup moins vite. Cependant cette technique est réservée aux très petites particules, soit la plupart des micro-algues unicellulaire (Person, 2010).

Dans ce contexte de récolte ; une bonne rétention nécessite des membranes de microfiltration (MF) ou d'ultrafiltration (UF) avec des pores allant de 0,5 μm à 0,02 μm (Person, 2010).

4-2-1-La procédure

Dans les conditions aseptiques, après la stérilisation du récipient et le support de la membrane à filtre sous la hotte à côté du bec bunsen, on place le récipient avec la pompe. Nous mettons le filtre à sa place puis nous versons la culture. Les cellules micro-algales restent sur la membrane et le liquide traverse la membrane.

4-3-Lyophilisation

La lyophilisation, est une opération de déshydratation à basse température qui consiste à éliminer par sublimation, la majeure partie de l'eau contenue dans un produit. Elle autorise une conservation à long terme grâce à l'abaissement de l'activité de l'eau du produit (Marin et René, 2000).

La lyophilisation consiste à ôter l'eau d'un produit liquide, à l'aide de la surgélation puis une évaporation sous vide de la glace sans la faire fondre (sublimation). Le principe de base est que lorsqu'on réchauffe de l'eau à l'état solide à très basse pression, l'eau se sublime, c'est -à-dire qu'elle passe directement de l'état solide à l'état gazeux. La vapeur d'eau (ou de tout autre solvant) quitte le produit et on la capture par congélation à l'aide d'un condenseur, ou piège froid. Cette technique permet de conserver à la fois le volume l'aspect, et les propriétés du produit traité. On distingue trois phases majeures dans un cycle de lyophilisation (Richmond, 2004).

4-3-1-La congélation

La congélation est faite pour solidifier l'eau de la matière micro-algales ou sont réfrigérés à une température -4°C ; l'eau se transforme alors en glace.

4-3-2-La dessiccation primaire

La dessiccation primaire Sous vide, consiste à sublimer la glace libre (interstitielle), donc sans effet d'ébullition (pas d'eau en phase liquide).

4-3-3-La dessiccation secondaire

Elle permet d'extraire par désorption les molécules d'eau piégées à la surface des produits séchés.

A la fin du cycle, le produit ne contient plus que 1% d'eau, ce qui est extrêmement faible.

Partie 2

1-Objectif

Notre travail a été réalisé au niveau des deux laboratoires, le laboratoire d'aquaculture et le laboratoire de microbiologie de l'école Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral.

L'objectif de ce travail est de réussir la culture de deux espèces de micro-algues (*Chlorella sp* et *Scenedesmus sp*) après leur identification et isolement. Les méthodes de base de la culture de micro-algues ont beaucoup évoluées. Le principe du procédé de culture repose sur des techniques relativement empiriques. Il existe plusieurs modes de culture, dans notre cas nous avons appliqué la méthode de culture en discontinu (batch).

Les étapes de procédé de culture se résument comme suit

- 1-Identification des souches de micro-algues à étudier ;
- 2-Préparation de milieu de culture ;
- 3-Isolment des souches de *Chlorella sp* et *Scenedesmus sp* sur un milieu solide ;
- 4-Repiquage et ensemencement ;
- 5-Mise en culture ;
- 6- Lecture par comptage du nombre de cellules micro-algales ;

2-Matériel utilisé

2-1-Matériel biologique

Souches de micro-algues: Il s'agit de deux espèces:

Chlorella sp ; la micro-algue verte unicellulaire d'eau douce qui se distingue des autres végétaux par une exceptionnelle concentration en chlorophylle (Salomez, 2009).

Scenedesmus sp ; la micro-algue verte non mobile qui comprend des cénobes de 4 à 8 cellules ellipsoïdales ou fusiformes alignées côte à côte (Bourrelly, 1966). Les souches ont été prélevées à partir des aquariums de la ferme aquacole expérimentale de l'école en mois d'Avril 2015. Les espèces ont été par la suite isolées et conservées dans des conditions bien déterminées (à l'état frais et à l'abri de l'humidité). Pour des raisons d'asepsie nous n'avons réussi que la culture de *Chlorella sp*.



Figure 8 : Aquariums de la ferme expérimentale à base desquelles les échantillons ont été prélevés.

2-2-Matériel et équipements utilisés

La culture des espèces de micro-algues demande un matériel, des équipements et des techniques spécifiques pour réaliser l'isolement et la mise en route de la culture et contrôler les paramètres du milieu dans un laboratoire et dans une salle de culture bien équipée où sont effectués le contrôle qualitatif et quantitatif de la culture. Les principaux équipements et matériels utilisés sont :

- Un frigidaire
- Autoclave et étuve
- Balance de précision.
- Agitateur magnétique.
- Epruvette graduée, erlenmeyer, des fioles, flacons, béccher de 1 L et 250ml.
- Papier paraffine.
- Pipette pasteur.
- Bec benzen.
- Anse de platine ; boîtes de pétri ; tubes à essai.
- Spatule et râteau.
- Système d'aération, système d'éclairage (Néon).
- Microscope optique; des lames; des lamelles; cellule de Malassez.

L'ensemble de matériel a été stérilisé avec de l'eau de javel et parfaitement rincé.

3- Echantillonnage

Nous avons prélevé 08 échantillons à partir des aquariums de la ferme de l'ENSSMAL, puis nous avons marqué chaque flacon pour se référer à l'aquarium correspondant afin de déterminer les espèces recherchées.



Figure 9 :Echantillons de micro-algues prélevés depuis les aquariums de la ferme (ENSSMAL).

4-Méthodes

4-1-Identification et entretien des micro-algues

4-1-1-Identification des micro-algues

Un fragment de chaque flacon a été déposé sur une lame dans une petite goutte d'eau physiologique, des observations aux différents grossissements ont été réalisées sous microscope optique.

L'identification des espèces a été réalisée en se basant sur les critères de détermination de Bourrelly (1966) et Ilits (1980). Après plusieurs observations, nous avons réussie à identifier les deux souches de micro-algues recherchées à savoir; *Chlorella sp* et *Scendesmus sp*.



Figure 10: Observation des lames aux différents grossissements sous microscope optique.

4-1-2-Choix du milieu de culture

Pour évaluer de façon satisfaisante les différents composants de la flore algale d'un biotope donné, il est préférable d'utiliser des milieux et/ou des conditions d'incubations sélectives (Reynold et Roger, 1977). Pour l'espèce *Chlorella sp*, le milieu choisi est celui de Meyer et pour la *Scenedesmus sp* le milieu de culture retenu est celui de Provasoli. Les compositions chimiques de ces deux milieux de culture son portées sur l'annexe N°1.



Figure 11 :Les composants des milieux de culture(Mayer et Provasoli).

4-2- Isolement

4-2-1-Isolement sur milieu solide

La technique est la même que celle pratiquée en bactériologie. Nous avons utilisé des boîtes de pétri remplies de gélose et enrichies en milieu de culture (Provasoli et Meyer). Nous avons étalé ensuite sur la gélose, à l'aide d'une anse de platine, une goutte contenant des cellules algales. Un premier développement apparaît. Nous avons prélevé à nouveau quelques cellules jeunes à croissance exponentielle que nous avons étalé sur une nouvelle boîte de pétri.

L'opération est reproduite à plusieurs reprises jusqu'à l'obtention d'un développement d'algue mono-spécifique qui correspond à la micro-algue recherchée (*Chlorella sp* et *Scenedesmus sp*). Cette technique d'isolement est assez longue et laborieuse (Audineau, 1985).

4-2-2-Préparation de milieu gélose et purification des cultures

La préparation de milieu de gélose se fait avec le mélange de milieu de culture et l'agar agar (100ml de milieu de culture et 2g de l'agar agar), puis nous avons introduit ce mélange dans l'autoclave pendant 15 minutes à $T= 121^{\circ}\text{C}$. Ensuite, nous avons laissé refroidir pendant 10 minutes, puis nous avons culé la gélose dans la boîte de pétri et nous avons laissé le liquide se transformer en gélose.



Figure 12 : Remplissage des boîtes de pétri par la gélose.

4-3-Le repiquage

Le repiquage consiste à dédoubler une souche mère pour obtenir deux souches filles.

La première étape de repiquage commence dans la boîte de pétri. Elle se fait en deux étapes, en premier lieu nous avons prélevé une goutte du flacon qui contient les différentes micro-algues, puis nous l'avonsensemencé dans une boîte de pétri.

La deuxième étape se fait à partir de la boîte précédente jusqu'à l'obtention des cellules mono-spécifiques; Ensuite, nous avonsensemencé dans des tubes à essai qui contiennent un volume 5ml de milieu de culture, passant progressivement d'un petit volume à un grand volume. L'opération de repiquage a concerné aussi bien le milieu de Mayer et de Provasoli. Les souches doivent être repiquées tous les quinze jours afin de les maintenir en bonne condition. Cette durée entre chaque repiquage est idéale pour conserver des cellules jeunes avec un bon potentiel de multiplication (Audineau, 1986).



Figure 13 : Le repiquage des micro-algues dans des boites de pétri en milieu solide.

4-4-Les conditions d'incubations

Les paramètres qui influencent sur la croissance des micro-algues sont la température, l'intensité lumineuse et la durée d'éclairement.

4-4-1-Température d'incubation

Toutes les souches micro-algues eucaryotes en culture se développent de manière satisfaisante à 25°C (Allen et Stanier, 1968).

4-4-2-Lumière artificielle

L'intensité lumineuse est généralement située entre 2000-3000 lux à la surface de récipients de culture (Stanier *et al.*, 1971).

4-4-3-Photopériode

Lumière/obscurité (24h / 0h) (Lavens *et al.*, 1996). Nous avons exposé nos boîtes à un éclairage permanent 24h/24h.

4-5-Ensemencement

On appelle ensemencement les manipulations à partir du 2litres. Tous les ensemencements sont réalisés en conditions stériles ; Le point de départ est toujours constitué par les souches. Elle consiste à passer progressivement d'un petit volume à un volume plus grand chaque quelques jours (4à7jours) avec doublement de 5 fois de volume initial (Audineau et Blancheton,1986).

4-6-Procédure de la culture

Après une incubation de 05jours, les tubes à essai contenant l'inoculum servent à l'ensemencement des Erlenmeyers de 250 ml contenant 200ml de milieu de culture. Ces derniers sont incubés pendant 5 à 7 jours, puis ils sont utilisés comme inoculum dans deux Erlenmeyers de volume de 1 litre chacun, contenant 800 ml de milieu de culture. Un Erlenmeyer de 1 litre est utilisé pour continuer la culture dans un jerrican de 5 litres. L'autre est utilisé pour faire le comptage.

4-7-Purification de milieu de culture par stérilisation à l'autoclave

Les tubes et les erlenmeyers servant au repiquage sont remplis avec du milieu de culture. Ils sont ensuite bouchés avec du coton et fermé avec du papier aluminium. Le tout a été autoclavé à 120°C pendant 10min. Une stérilisation de l'ensemble est indispensable pour éviter toute contamination et empêcher l'installation d'autres microorganismes qui rentrent en compétition avec les micro-algues. Un contrôle régulier sous microscope optique permet de s'assurer de l'absence de contamination du milieu. La figure 14, résume toutes les étapes de la culture.

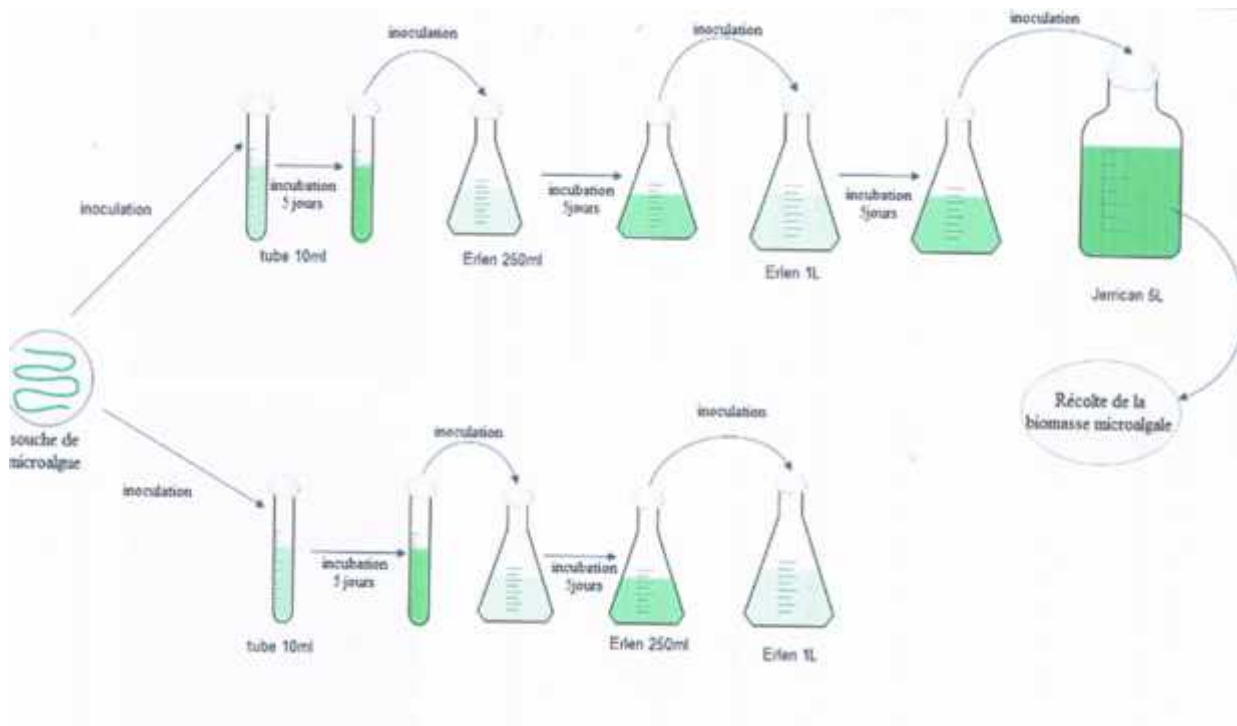


Figure 14 :Les étapes de la culture des micro-algues.

4-8-Entretien des cultures

En pratique, la flamme est placée à 3-4 cm du col du ballon qui va êtreensemencé. Ce ballon est débouché dans la zone aseptique. Il en est de même pour l'inoculum. Il est versé dans le nouveau milieu de culture en restant bien dans la sphère stérile. Il faut prendre garde à ne pas verser le dépôt qui se trouve au fond du ballon d'inoculum. Ce dépôt est formé de cellules mortes qui pourraient freiner la croissance de la culture.

4-9-Etude biométrique de la culture (cinétique)

Il existe plusieurs moyens d'évaluation de la quantité de micro-algues présentes dans les cultures, soit par comptage soit par la densité optique (Barnabé, 1989).

4-9-1-Le comptage des cellules algales

Les différentes phases de la croissance ont été déterminées grâce à des comptages de cellules phytoplanctoniques régulières à l'aide d'une cellule de Malassez. La cellule de comptage a une profondeur connue et un quadrillage défini qui donnent un volume déterminé.

Un erlenmeyer de 1litre contenant 800 ml de milieu de culture est utilisé pour faire le comptage des cellules de *Chlorella sp.*

Les micro-algues sont prélevées à l'aide d'une pipette pasteur et introduites sur la zone de comptage (entre lame et lamelle) par capillarité.

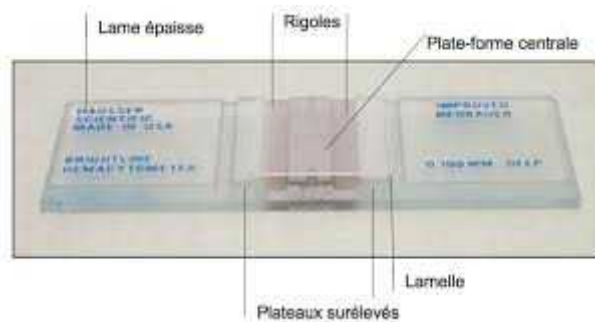


Figure15 : Introduction des micro-algues dans la zone de comptage de la cellule Malassez.

Le comptage des micro-algues mobiles n'est possible que si elles sont préalablement fixées ; pour ce fait nous avons ajouté trois gouttes du mélange (2ml du formol + 8 ml d'eau distillé) dans 4 ml de la culture micro-algue (Audineau, 1985).



Figure 16 : Observation de *Chlorella sp* sous microscope GX10.

A-Définition de l'hématimètre (cellule de malassez)

Les hématimètres sont des lames de verre épaisses creusées de rigoles et présentant un quadrillage particulier sur la plate-forme centrale légèrement abaissée, recouverte d'une lamelle posée sur les plateformes latérales élevées, un volume très précis et connu permet de dénombrer les cellules (Najjar, 2012).

B-Présentation des cellules de numération

La cellule de Malassez possède un quadrillage spécifique comportant 100 rectangles. Parmi les 100 rectangles totaux, on trouve 25 rectangles qui sont divisés en 20 petits carrés afin de faciliter le comptage.

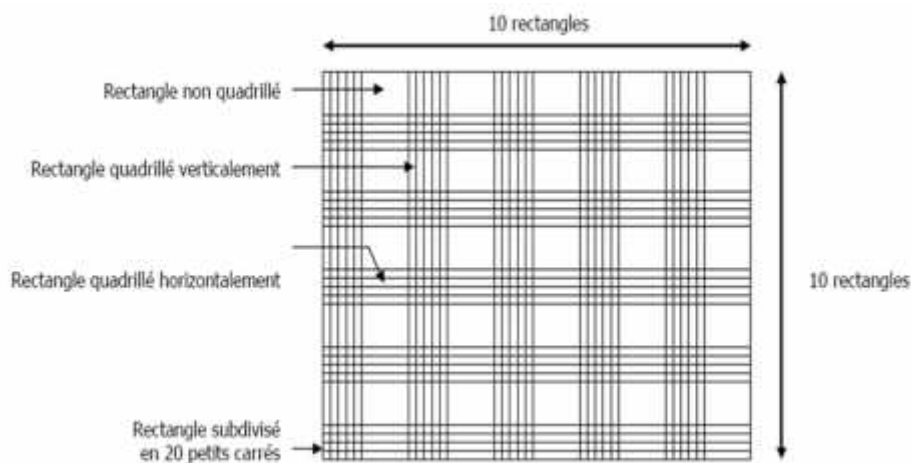


Figure 17 : Quadrillage de la cellule Malassez (Najjar, 2012).

Le volume de comptage est déterminé par la surface du quadrillage gravé sur la lame et la profondeur de la chambre.

Le volume correspondant au quadrillage total est égal à $1 \text{ mm}^3 = 10^{-6} \text{ dm}^3$.

Chaque rectangle correspond à un volume 100 fois plus faible, soit $0,01 \text{ mm}^3 = 10^{-8} \text{ dm}^3$.

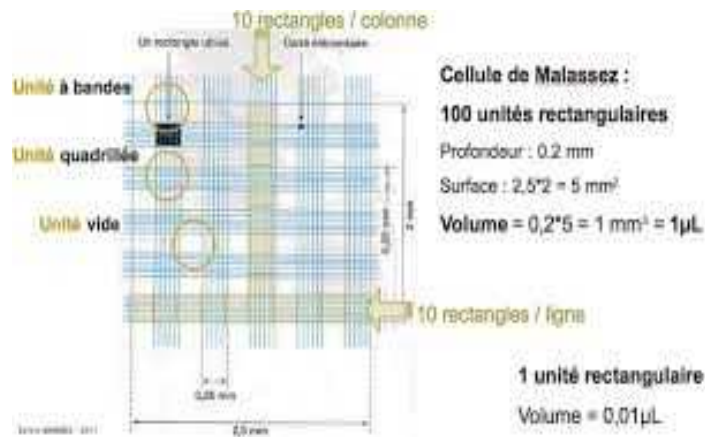


Figure 18 : Le volume de comptage de la cellule Mallassez.

Une cellule de numération est une lame porte objet dans laquelle est creusée une chambre de comptage de volume connue.

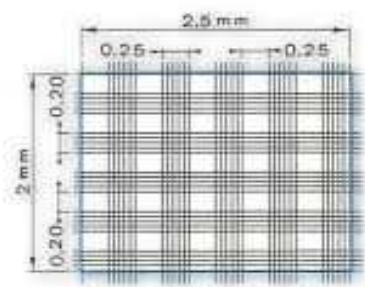


Figure 19: La surface du quadrillage.

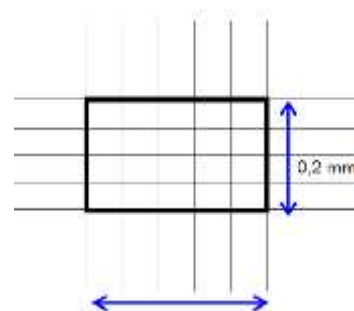


Figure 20: La profondeur de la chambre.

C-Numération

- Nous avons observé à l'objectif x10 pour repérer la position du quadrillage, et vérifier l'homogénéité de la répartition des cellules à compter (si la répartition est mauvaise, l'opération doit être recommencée).
- Ensuite nous avons observé à l'objectif x40 pour réaliser le comptage (1 rectangle par champ).
- Puis nous avons compté les cellules contenues dans 4, 10, 20 ou dans la totalité des 100 rectangles du quadrillage.

Remarque : pour les cellules chevauchant les lignes de quadrillage, nous avons compté seulement celles qui chevauchent 2 arêtes du rectangle sur 4 (en pratique, on choisit de prendre en compte les cellules chevauchant la ligne horizontale supérieure, et la ligne verticale droite).

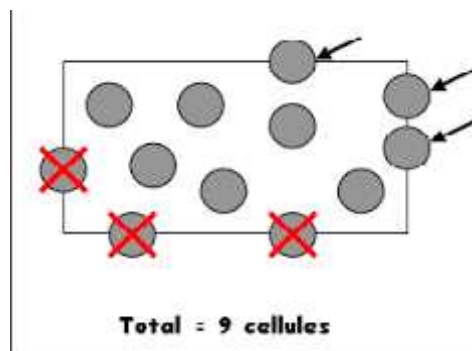


Figure 21 : Numération sur le rectangle = 9 cellules

Dans notre étude nous avons pris des photos avec un appareil photo et à l'aide du logiciel « Zeizz » sous un microscope relié à un microordinateur.

Partie 3

1-Identification des souches

A l'aide de microscope optique, nous avons pu observer les différentes formes de cellules (unicellulaires ou associées), le nombre, la localisation des flagelles, le type de division, la couleur et la mobilité des espèces.

Les clés de détermination de Bourrelly (1966) et Ilits (1980), nous ont permis d'identifier les deux genres d'espèces qui ont fait objet de notre étude à savoir *Chlorella sp* et *Scenedesmus sp*.

1-1-Espèce *Chlorella sp*

La chlorelle est une cellule de petite taille, son diamètre varie de quelques microns à 20 microns au maximum, toujours solitaire, de forme sphérique ou ellipsoïdale, à membrane distincte, avec 1 ou rarement 2 plastides, parfois un pyrénoloïde.

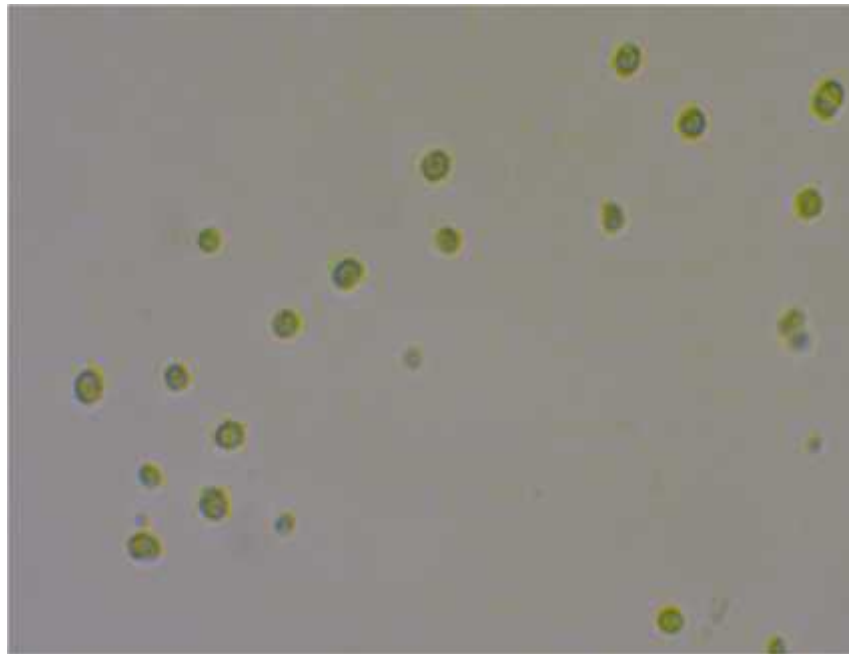


Figure 23 : Photographie de l'espèce *Chlorella sp* observée au microscope optique G 100.

1-2-Espèce *Scenedesmus sp*

Scenedesmus est une micro-algue verte non mobile, comprend de 2 jusqu'à 4 cellules ellipsoïdales ou fusiformes alignées côte à côte, leurs grands axes étant parallèles. Les cellules sont souvent ornementées d'épines. Les cellules marginales du cénobe ayant souvent une ornementation différente de celles du centre.

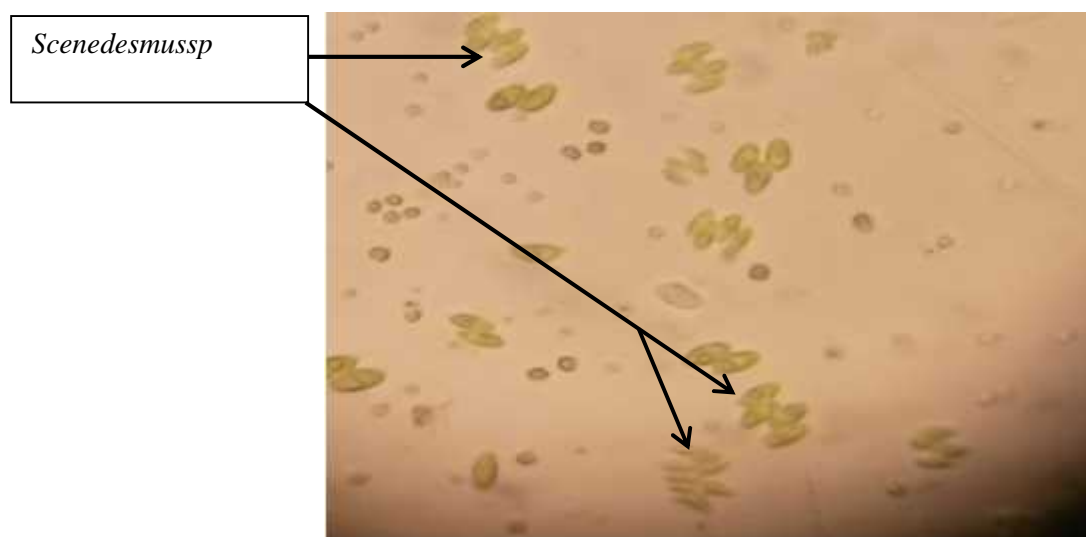


Figure 24 : Photographie de l'espèce *Scenedesmus sp* accompagnées d'autres espèces observées sous microscope optique G100.

2-Résultats

Le volume final de notre culture est de 5L. Cependant, nous avons arrêté le comptage des cellules de chlorelle au niveau de l'erenmeyer de 1L.

2-1 Calcul de la concentration cellulaire

La cellule de Malassez permet de compter le nombre de cellules en suspension dans une solution, c'est une lame de verre sur laquelle est gravé 25 rectangles contenant eux même 20 petits carés.

Après avoir effectué la manipulation, nous avons calculé la concentration cellulaire de la suspension des cellules étudiées.

Formule de comptage

$$\text{Nombre de cellules (n)} = \frac{C_1 + C_2 + C_3 + \dots + C_{25}}{25} \cdot 10^5 \text{ Cellules/ml}$$

C : Nombre de cellules de Chlorelle comptées dans un caré (25 carrés)

Formule de concentration cellulaire

$$N \times V = n \times v \quad N = n / V$$

Soient :

-n : nombre moyen de Chlorelles comptées dans la cellule Malassez.

-v : volume de comptage (10^{-2} ul)

-V : volume de l'échantillon.

-N : nombre moyen (concentration) de Chlorellesde l'échantillon (par litres).

-f : facteur de dilution.

Si la solution avait été diluée : $N = (n / V) \times f$

Dans notre cas nous n'avons fait aucune dilution, donc $f=1$

La concentration cellulaire = nombre de cellules comptées /volume de l'échantillon.

$$N = n / V$$

$$N = \frac{C_1 + C_2 + C_3 + \dots + C_{25}}{25} \cdot 10^2 \text{ Cellules/ L}$$

Tableau 3 : Evolution de la concentration de *Chlorella sp* exprimée en nombre de cellules/ml en fonction de temps.

Jours	Nombre de Cell /ml.10 ⁻⁵
1	102
2	126
3	261
4	481
5	923
6	1002
7	995
8	971
9	851

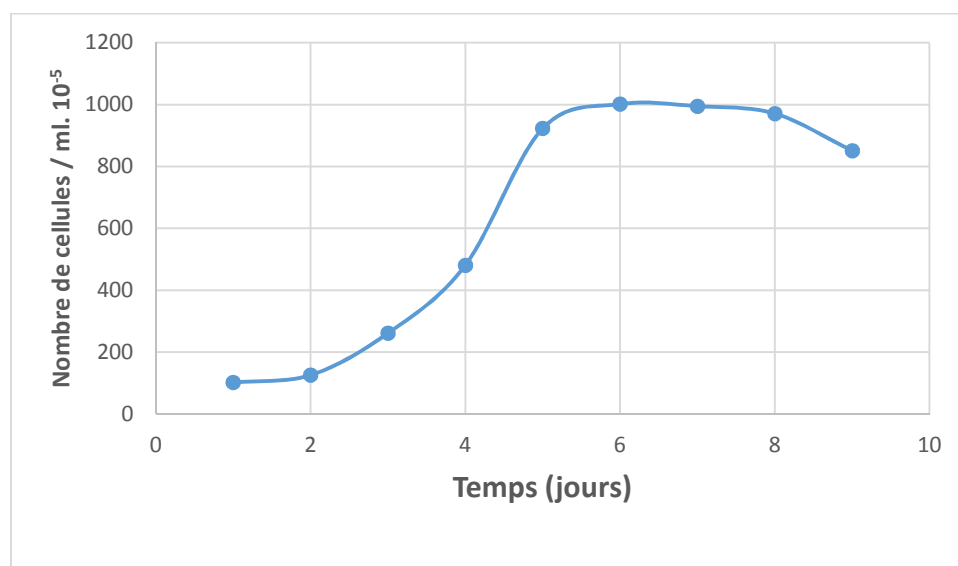


Figure25 : Courbe de croissance de *Chlorella sp* en fonction du temps.

2-2 Taux de croissance spécifique de *Chlorella sp*

Le taux de croissance de la Chlorelle a été calculé en appliquant l'équation suivante :

$$\text{Le taux de croissance spécifique (u)} = \ln (N_t/N_0)/T_t-T_0$$

N_t : Nombre de cellules à la fin de la phase exponentielle.

N_0 : Nombre de cellules au début de la phase exponentielle.

T_t : Le dernier jour de la phase exponentielle.

T_0 : Le premier jour de la phase exponentielle.

$$\text{Taux de division (K)} = u / 0.6931$$

$$T_t = 0,6931 / u$$

Tableau 4 : Détermination du taux de croissance spécifique.

Espèce	u (j ⁻¹)	K (division / jour)	T _t (jours)
<i>Chlorella sp</i>	0,66	0,95	1,05

3-Interprétation des résultats

La croissance d'une culture est généralement exprimée comme l'augmentation d'une biomasse, d'un nombre de cellules ou d'un taux de chlorophylle par unité de temps. Pour l'étude de la cinétique de la culture de Chlorelle, nous avons fait appel à la méthode directe de comptage de nombre de cellules à l'aide d'un hématocymètre sous microscope optique, les résultats obtenus sont parti sur le tableau 3 et la figure 25.

Nous avons choisit le milieu de culture Mayer considéré (d'après les données bibliographiques) le plus favorable au développementdes cellules de *Chlorella sp*. Toutefois, la préparation de ce milieu reste souvent couteuse pour l'aquaculture.

Pour des raisons d'asepsie (contamination du milieu de culture de *Scenedesmus sp*) notre étude a portée sur une seule espèce à savoir *Chlorella sp*.

Durant les 09 jours de culture nous avons constaté que la taille de notre espèce cultivée a augmenté avec augmentation du nombre de cellules. Au-delà du 15^{ème} jour, nous avons observé l'absence totale des micro-algues dans le milieu de culture à cause de l'épuisement des nutriments (tableau 3 et figure 25).

3-1- Cinétique de la croissance

D'après la figure 25 qui illustre la cinétique de croissance de *Chlorella sp* nous parvenons à constater que la courbe d'évolution peut être répartie en quatre phases. Ces différentes phases ont été déterminées suite au comptage régulier des cellules phytoplanctoniques à l'aide de la cellule Malassez. La première phase débute du 01^{er} au 2^{ème} jour, elle correspond à la phase d'adaptation. La phase exponentielle commence à partir du 2^{ème} jour et s'étend jusqu'au 5^{ème} jour, marqué par un accroissement important du nombre de cellules qui passe de $1,02 \times 10^5$ à $9,23 \times 10^5$ cellules/ml au bout de 3 jours seulement. Cet accroissement est dû aux bonnes conditions de culture.

La 3^{ème} phase appelée phase stationnaire qui débute à partir du 5^{ème} jour et dure environ 3 jours au cours de cette phase le nombre de cellules subit une variation minimale, en dernier, la phase de déclin, elle commence juste après le 8^{ème} jour, cette diminution du nombre de cellules est due à l'épuisement du milieu.

Lors de la mise en culture, tous les éléments essentiels à la croissance de l'algue (lumière, Azote, phosphore, carbone, micro éléments et nitrites) sont apportés au temps zéro de la culture.

Ces derniers, vont être consommés au fur et à mesure (tout au long de la culture) par les algues (Chlorelles) ainsi leur concentration va diminuer dans le milieu.

L'accroissement de la biomasse algale (concentration cellulaire) dans le milieu va stagner, lorsque l'un de ces éléments nutritifs se montre en quantité trop réduite ou absente 'facteur limitant' pour soutenir le métabolisme de reproduction des cellules.

La composition biochimique, les capacités physiologiques et la vitesse à laquelle la cellule se divise vont être alors modifiées (Cullen *et al.*, 1992).

3-1-1-Phase de latence

Correspond à l'adaptation, les cellules ont besoin d'un temps d'acclimatation aux nouvelles conditions de culture qui lui sont appliquées.

Cette phase est de courte durée (2j) plus la culture est âgée plus la phase de latence est longue.

L'âge de la souche est le premier facteur conditionnant le temps d'adaptation, en effet, les cellules provenant d'une culture jeune en phase de croissance exponentielle, sont celles qui se divisent rapidement. Cependant, celles issues d'une culture en phase stationnaire, contiennent plusieurs cellules mortes et la plupart âgées, d'un état physiologique peu favorable à la division.

L'adaptation aux nouvelles conditions est le second facteur de reprise de la croissance, c'est-à-dire que les Chlorelles font adopter leurs équipements enzymatiques aux nouvelles sources de nourritures. De ce fait, elles doivent incorporer les nutriments nécessaires à la fabrication des enzymes et d'autres métabolites nécessaires pour se diviser.

3-1-2-Phase exponentielle

Au cours de laquelle, la croissance est accélérée, les cellules se divisent dans un temps appelé «temps de division» en se divisant, les cellules de Chlorelle épuisent les nutriments du milieu mis à leur disposition. Elles ne s'arrêtent que lorsque un élément nutritif devient 'facteur limitant' ou absent. Anderson (2005), confirme que la vitesse de croissance en cette phase est à son maximum car les conditions du milieu sont optimales.

C'est pendant cette phase que l'on utilise une culture, les cellules sont en pleine performance, elles ont accumulé suffisamment de composés intracellulaires.

Le temps de génération qui est défini comme étant l'intervalle de temps qui sépare deux divisions successives est très court et constant. La durée de cette intervalle est en fonction des conditions de culture (T° , PH, lumière, concentration en sel nutritifs et de l'espèce cultivée).

3-1-3-Phase stationnaire

Au fur et à mesure de la phase exponentielle, le milieu de culture devient de moins en moins favorable, aux divisions car les facteurs de croissances commencent à manquer.

De ce fait, la croissance de la culture stagne, mais le nombre de cellules reste constant. Ceci se traduit par l'équilibre entre les divisions cellulaires et la disparition des autres cellules mortes par autolyse.

Certains composés comme les lipides, les glucides vont continuer à s'accumuler dans les cellules pendant cette période (Anderson, 2005). Au temps que les cellules possèdent des produits de stockages leur permettant d'alimenter leur métabolisme, ceci leur permet de survivre (Richmond, 2004). Donc la quantité de cellules qui meurent est compensée par le nombre de cellules qui se reproduisent ce qui maintient l'état d'équilibre.

3-1-4-Phase de décroissance

Arrivée à cette étape les cellules de *Chlorella* épuisent tous leurs réserves intracellulaires, et ne seront pas en mesure d'assurer l'énergie nécessaire au processus de maintenance cellulaire et finissent par mourir (Richmond, 2004). La quantité de cellules qui meurent est fortement supérieure à celle capables de se reproduire. Cependant, certaines espèces de micro-algues ont la faculté de rentrer en dormance lorsque les conditions sont défavorables et reprennent le cycle de vie (activité) dès que les conditions favorables du milieu sont rétablies (Richmond, 2004).

3-2- Le taux de croissance spécifique

Le taux de croissance spécifique obtenue pour la culture de *Chlorella* est de ($0,66 \text{ j}^{-1}$) soit 0,95 divisions par jour (tableau 4). Le résultat obtenu semble inférieur à celui rapporté par Robert *et al* (1987), est qui est de $\mu=1,38$ avec une durée de phase exponentielle de 04 jours. Cette différence peut être expliquée par le manque de vitamines dans le milieu de culture. Azma *et al* (2010), mentionnent que la croissance de *Chlorella* est considérablement influencée par le type de milieu utilisé. Le taux de doublement indique que les cellules de *Chlorella sp* peuvent se diviser chaque jour.

Kherarba (2013), détermine un taux de croissance spécifique pour une autre espèce de micro-algue *Chlamydomonas sp* de $0,29 \text{ j}^{-1}$. Alors que Hadiyanto (2012) a obtenu une valeur inférieure de $0,33 \text{ j}^{-1}$. Dans le cas de *Scenedesmus sp*, Kherarba (2013), a signalé un taux de $0,31 \text{ j}^{-1}$ qui correspond à 0,24 divisions par jour. Jayashree *et al* (2012), indiquent un taux pratiquement identique qui vaut $0,38 \text{ j}^{-1}$.

Ces résultats démontrent clairement que l'espèce *Chlorella sp* représente la meilleure croissance, ce qui justifie le choix de sa culture dans différents domaines d'application.

Conclusion

La mise en culture de micro-algues réalisée nous a permis de contrôler les différents paramètres nécessaires à leur développement. La maîtrise de cette culture nécessite une surveillance et un travail rigoureux.

Pour réduire au maximum les contaminations du milieu de culture par d'autres micro-organismes et obtenir de meilleurs résultats, la culture doit passer par l'étape de purification. Pour ce faire, nous avons fait appel à la stérilisation par autoclave, toutefois cette procédure est insuffisante pour la culture de *Scenedesmus*. Il est également nécessaire de réaliser plusieurs repiquages afin d'isoler l'espèce que l'on désire cultiver et empêcher le développement d'autres micro-algues.

Ce travail peut être complété par la récolte et l'analyse des constituants biochimiques de la récolte. Il est primordial de maintenir le point de départ de la culture (souches de micro-algues) car il conditionne toute la suite de la production.

La maîtrise de culture des micro-algues à petite échelle est donc une étape indispensable pour aborder la culture à grande échelle. Celle-ci permet de réaliser un grand nombre d'expériences tout en limitant les volumes manipulés, le temps de travail et les coûts de matière première.

Références bibliographiques

ALLEN, M.M. et STANIER, R.Y.(1968). Selective isolation of blue-green algae from water and soil. *J.gen. Microbiol*, p. 203-209.

AZMA, M ROSFARIZA, M RAHA, A ARBAKARIYA, B ARIFF, (2010). Culture and adaptation to Heterotrophic Cultivation Improved protocol for the Preparation of *Tetraselmis succica axenic*. *The open biotechnology journal* 4, p. 36-46.

ANDERSEN, R.A.(2005). Algal culturing techniques. USA: Elsevier Academic press. p. 125-126.

AUDINEAU, P et BLANCHETON, G. (1986). Production d'algues unicellulaires. Rapport IFREMER, p. 20.

BARNABE.G,(1989). Aquaculture tome 1, Ed. Lavoisier, p. 181-192.

BECKER, W.(2004). Microalgae in human and animal nutrition. In: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Richmond USA: Blackwell Publishing p 312-351.

BECHAGRA, A. (1996). La culture des micro-algues. Mémoire DEUA ENSSMAL, 52 p.

BECERRACELIS, G. (2009). Proposition de stratégies de commande pour la culture de micro algue dans un photo bioréacteur continu, Ecole Centrale Paris, 266 p.

BLACKWELL, W. (2013). *Handbook of microalgal culture applied phycology and biotechnology* second edition , p.703.

BLANCHETON, A.(1986). Production d'algues unicellulaires, Paris : IFREMER ,p. 35.

BOURRELLY, P. (1966). Les algues d'eau douce. Initiation à la systématique. Tome 1, 572 p.

CHADER, S. (2003). La génie des micro-algues de l'aliment au carburant, bulletin des énergies renouvelables (CDER Bouzareah) , p. 01.

CAVALLA, M. (2000). Les Algues-les micro-algues ,p. 17.

CARLSSON A.S., van Beilen J.B., Möller R., Clayton D., 2007. Micro-and macro-algae: utility for industrial applications, In: Bowles D, editor. *Outputs from the EPOBIO project*. UK: CPL Press, p. 82.

CADORET, J.P.(2008) . Laboratoire de l'IFREMER de Nantes.

DANGEARD, A.P. (1921). Observations sur une algue cultivée en obscurité depuis huit ans *C.Rhebd Séances acad.*

- DIOUF,D.(2009).** Production d'aliments enrichis en acides gras polyinsaturés à partir de micro-algues pour les besoins aquacoles, Rimouski, p. 123.
- DURAND, J.R.(1980),** Flore et faune aquatiques de l'Afrique sahel-Soudanienne, Volume 1. p. 389.
- DABBADIE, L.(1992).**Cultures intensives de micro algues sur lisier de porc: performances, contraintes, utilisation des biomasses, école nationale supérieure agronomique de montpellier p 125.
- DROOP, M.R.(1974).**Heterotrophy of carbon in STEWART W.D.P , (ed) Algal physiology and biochemistry UnivCalif press, Los Angles.
- FIALA, M.(1978).** Culture d'algues In Phytoplankton : Biomasse, production, numération et culture. Ed du Castillet. p. 77-97.
- FOGG, G. E .(1953).**The Metabolism of Algae Methuen, London; Wiley, New York, 149 p.
- FOX, R.D.(1999).** Spiruline, Technique, pratique et promesse. France : Edisud,.
- GOUVEIA,L ; NOBRE B.P , MARCELO F.M, MEREJEN S, CARDOSO M.T, Palavra A.F,Mends RL,(2007).** Functional food oil coloured by pigments extracted from micro-algae with supercritical CO₂. Food Chimestry, volume 101,p. 717-723.
- HOFF ,F.H.SNELL T.W.(2001),** Plankton culture manual. 5^{ème} edition. Florida Aqua Farms, Inc. USA. p 4-7, 11-20.
- ILITS,A. (1980)** Les algues in: Durand J-R et le Leveque C. Flore et faunes aquatiques de l'Afrique sahélo-soudannienne.Tome 1. France :Orstom, p .10.
- KHERARBA, M, (2003).** Contribution à la culture des espèces de micro-algues d'eau douce à intérêt aquacole (*Chlamydomonas sp* , *Scenedesmus sp*). Mémoire ingénieur ENSSMAL, 69p.
- KIM, M.K. et PARK, J.W. et PARK, C.S.(2007).** Enhanced production of *Scenedesmus*. (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater. Bioresource Technology 98. p. 2220-2228.
- KARINE, V. GUILLERMINO, M. (2004).** La production de micro-algues en conditions contrôlées.
- LARDIERE, G.(2004)** . Etude structurale des polysaccharides pariétaux de l'algue rouge *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniales). p. 332.
- LAVENS,P. SORGELOOS, P.(1996).** Manual on the production and use of live food for aquaculture FAO .Fisheries Technical Paper.

PALAVRA A.F , MENDES R.L,(2007), Functional food oil coloured by pigments extracted from microalgae with supercritical CO₂, Food Chemistry, Elsevier 101 p.

PERSON, J.(2010) ; Livre Turquoise, Algues, filières du future, Colloque Algues, Adebitech Romainville, p. 163.

PEREZ, R.(1997).Ces algues qui nous entourent. Conception actuelle, rôle dans la biosphère, utilisations, culture.

PERSON J ,(2010). livre Turquoise ,Algues, filières du future, Colloque Algues,Adebitech Romainville.

REYNAUD, P. A. et ROGER P.A.(1977). Milieux sélectifs pour la numération des algues eucaryotes, procaryotes et fixatrices d'azote. p. 421-428.

RICHMOND,A.(2004). Handbook of microalgal culture-biotechnology and applied phycology. Oxford , p. 228- 230.

ROBERT. R et HIS ,(1987) Croissance et spectre de tailles de six algues utilisées pour la nutrition de larves de bivalves en éclosure, en culture non renouvelée. Quai du commandant Silhouette,33120 Arcachon, France : IFREMER. p. 09.

STEVENSON, R.J.(1996), Bothwell M.L., Lowe R.L.,. Algal ecology.Freshwater Benthic Ecosystems. Elsevier Academic Press, San Diego, California, USA: p753.

STANIER, R. Y. KUNISAWA, R. MANDEL, M. COHEN, B. (1971). Purification and properties of unicellular blue - green algae (order Chlorococcales). Bacteriological Reviews, , p. 171-205.

SALOMEZ, M.(2009) .Opportunités de développement de la filière micro algues a l'île de la reunion site web ARER p. 91.

WIEDEMAN,V.E. (1970). Heterotrophic nutrition of waste-stabilization pond algae.New-York-London: 107-114. In : Dabbadie L., 1992.Mention : production animale. ENSA de Montpellier, France , p. 17.

ZARROUK, C, (1966) .Contribution à l'étude d'une cyanophycée influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse, p. 96.

Sites d'internet

ALLEN, M.M. et STANIER, R.Y.(1968). Selective isolation of blue-green algae from water and soil.J.gen. [en ligne]. Consulté le [12/03/2015]. Disponible sur le web : www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5652096

ANDERSEN, R.A.(2005). Algal culturing techniques [en ligne]. Consulté le [09/05/2015]. Disponible sur le web :<https://www.elsevier.com/.../andersen/978-0-12-0884>

- AUDINEAU, P et BLANCHETON, G. (1986).** Production d'algues unicellulaires [en ligne]. Consulté le [09/05/2015]. Disponible sur le web : archimer.ifremer.fr/doc/1986/rapport-1749.pdf
- AZMA, M ROSFARIZA, M RAHA, A ARBAKARIYA, B ARIFF, (2010).** Culture and adaptation to Heterotrophic Cultivation Improved protocol for the Preparation of *Tetraselmis succica axenic*. [en ligne]. Consulté le [09/05/2015]. Disponible sur le web : <http://benthamopen.com/TOBIOTJ/VOLUME/4/>
- BECKER, W.(2004).** Microalgae in human and animal nutrition. [en ligne]. Consulté le [05/06/2015]. Disponible sur le web : <http://eu.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-0632059532.html>.
- CADORET, J.P.(2008).** Jean-Paul Cadoret - Ifremer [en ligne].Consulté le [15/01/2015] Disponible sur le web : <http://annuaire.ifremer.fr/cv/15837/>
- CAVALLA, M. (2000).** Les Algues-les micro-algues. [en ligne]. Consulté le [07/06/2015]. Disponible sur le web : mcavallafree.fr/rsr/Algues_operon.pdf
- CHADER, S .(2003),** Le Génie des Micro-Algues. [en ligne]. Consulté le [19/09/2015]. Disponible sur le web : www.cder.dz/vlib/bulletin/pdf/bulletin_004_09.pdf
- DABBADIE, L.(1992).** Cultures intensives de micro-algues sur lisier de porc: performances, contraintes, utilisation des biomasses. [en ligne]. Consulté le [09/07/2015]. Disponible sur le web : aquatrop.cirad.fr/bibliothèque/mémoires.
- DURAND, J.R.(1980),** Flore et faune aquatiques de l'Afrique sahélo-Soudanienne. [en ligne]. Consulté le [09/07/2015]. Disponible sur le web <https://books.google.dz/books?isbn=2709909340>
- DROOP, M.R.(1974).** Algal physiology and biochemistry. [en ligne]. Consulté le [19/08/2015]. Disponible sur le web : [https://books.google.dz/books? isbn=0299105601](https://books.google.dz/books?isbn=0299105601).
- FOGG, G. E .(1953).** The Metabolism of Algae Methuen [en ligne].Consulté le [05/07/2015]. Disponible sur le web: www.sciencemag.org > 6 August 1954 -.
- FOX, R.D.(1999).** Spiruline, Technique, pratique et promesse. [en ligne]. Consulté le [03/06/2015]. Disponible sur le web : <http://www.decitre.fr/livres/spiruline-9782744901003.html>.
- KARINE, V. GUILLERMINO, M. (2004).** La production de micro-algues en conditions contrôlées.[en ligne]. Consulté le [03/02/2015]]. Disponible sur le web : <http://www.ceva.fr/fre/content/download/8970/.../Algorythme%20n°66.pdf>
- KOJIMA, et al. (1995).** Protiste images : Scenedesmus [en ligne]. Consulté le [15/04/2015]. Disponible sur le web : <http://protist.i.hosei.ac.jp/pdb/images/chlorophyta/scenedesmus/Scenedesmus.jpg>>.

LARDIERE, G.(2004). Etude structurale des polysaccharides pariétaux de l'algue rouge *Asparagopsis armata* [en ligne]. Consulté le [05/02/2015]. Disponible sur le web : Lardiere S Garon-Lardière - 2004 - archimer.ifremer.fr

LAVENS,P. SORGELOOS, P.(1996). Manual on the production and use of live food for aquaculture FAO. [en ligne]. Consulté le [15/06/2015]. Disponible sur le web : <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/003/w3732e/w3732e00.pdf>.

PALAVRA A.F , MENDES R.L,(2007), Functional food oil coloured by pigments extracted from microalgae with supercritical CO₂. [en ligne]. Consulté le [15/05/2015]. Disponible sur le web : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814606001439>

PEREZ, R.(1997). Ces algues qui nous entourent. Conception actuelle ,rôle dans la biosphère, utilisations, culture. [en ligne]. Consulté le [09/07/2015]. Disponible sur le web : [https://www.google.dz/?gws_rd=cr&ei=ni1nVv_FOeCygPi_r6wDA#q=PEREZ%2C+R.\(1997\)](https://www.google.dz/?gws_rd=cr&ei=ni1nVv_FOeCygPi_r6wDA#q=PEREZ%2C+R.(1997)).

RICHMOND,A.(2004). Handbook of micro algal culture-biotechnology and applied phycology. [en ligne]. Consulté le [05/09/2015]. Disponible sur le web : <http://eu.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-0632059532.html>.

REYNAUD, P. A. et ROGER P.A.(1977). Milieux sélectifs pour la numération des algues eucaryotes, procaryotes et fixatrices d'azote. [en ligne]. Consulté le [19/09/2015]. Disponible sur le web : www.pierre-armand-roger.fr/publications/pdf/34_tairou.pdf

SALOMEZ, M.(2009) .Opportunités de développement de la filière micro algues a l'île de la reunion. [en ligne]. Consulté le [09/07/2015]. Disponible sur le web : http://www.arer.org/IMG/pdf/428_rapport-de-stage-ARER-sept-2009-melanie-salomez.pdf.

STEVENSON, R.J.(1996). Bothwell M.L., Lowe R.L.,Algal ecology.Freshwater Benthic Ecosystems. [en ligne]. Consulté le [05/09/2015].Disponible sur le web : <http://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1008012630844>

STANIER, R. Y. KUNISAWA, R. MANDEL, M. COHEN, B. (1971). Purification and properties of unicellular blue - green algae (order Chlorococcales) . [en ligne]. Consulté le [05/06/2015]. Disponible sur le web : www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4998365

WIEDEMAN,V.E. (1970). Heterotrophic nutrition of waste-stabilization pond algae.New-York-London. [en ligne]. Consulté le [01/07/2015]. Disponible sur le web <https://books.google.dz/books?isbn=1461343283>

www.aquaportail.com. anemone-clown_1245142384_chlorelle-chlorella-vulgaris-var-vulgaris.jpg[en ligne]. Consulté le [25/04/2015]. Disponible sur le web : http://www.aquaportail.com/pictures0906/anemone-clown_1245142384_chlorelle-chlorella-vulgaris-var-vulgaris.jpg

www.ifremer.fr/ .culture micro algues [en ligne]. Consulté le [25/04/2015]. Disponible sur le web :<http://www.ifremer.fr/ncal/Biodiversite-et-ressources/Microalgues/Culture-de-microalgues>.

ZARROUK, C, (1966). Contribution à l'étude d'une cyanophycée influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse [en ligne]. Consulté le [5/07/2015]. Disponible sur le web :<http://www.worldcat.org/.../contribution...letude.../4918188>

Annexe Les deux milieux de culture utilisés pour la culture de *Cholorella sp* et *Scenedesmus sp*

1- Milieu de culture Provasoli, pour un litre d'eau il faut

Les composants	Les concentrations
Nitrate de Sodium NaNO_3	56,10 mg/l
Na_2 glycérophosphate	07,65 mg/l
Fe-EDTA	2,50 mg/l
Cyanocobalimine (B12)	1,60 ug/l
Biotine (H)	0,80 ug/l
Thiamine-HCL (B1)	20,00 ug/l
Trisy	20 mg/l
Zinc (Zn)	15,90 mg/l
Manganese (Mn)	02,60 mg/l
EDTA	2,68 mg/l
Bore (B)	18,27 mg/l

2-Milieu de culture Meyer, pour un litre d'eau il faut :

Les composants	Les concentrations
Nitrate de potassium (KNO_3)	1.21g/L
Sulfate de Magnésium ($\text{Mg SO}_4,7\text{H}_2\text{O}$)	2,46g/L
Phosphate de pépostassique (K_2HPO_4)	1,23 g/L
Sulfate de fer ($\text{Fe (SO}_4)_3$)	0,052g/L
Citrate de sodium	0,195g/