

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
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



**Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du
diplôme d'étude universitaire appliqué en sciences de la mer**

Option : Aquaculture

Thème :

*Contribution à l'étude de la croissance de deux
microalgues utilisées en aquaculture*

Présenté par :

- AMIROUCHE Adel
- BENACHRINE Sofiane

Promotrice:

M^{elle} MERBAH.S Attachée de recherche CNRDPA

Examinatrice: M^{me} OULD AHMED ENSSMAL

Promotion : 2011/2012

- SOMMAIRE -

Introduction	2
CHAPITRE 1: Généralités	
1. Généralités.....	4
1.1. Systématique et morphologie.....	5
1.1.1- <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	5
1.1.2- <i>Tetraselmis suecica</i>	6
1.2. Ecologie générale.....	7
1.2.1. Lumière.....	7
1.2.2. Température.....	7
1.2.3. Sels nutritifs.....	7
1.2.4. Salinité.....	7
1.2.5. Ph.....	7
1.3. Répartition géographique.....	8
1.4. Biologie.....	8
1.4.1. Reproduction.....	8
1.4.2. Photosynthèse.....	8
1.4.3. Valeur alimentaire.....	8
1.5. Culture des micro-algues.....	9
1.5.1. Types de culture.....	10
1.6. Croissance des micro-algues.....	10
1.6.1. Etapes de croissance des cultures.....	10
1.6.1. 1. Phase de latence.....	10
1.6.1. 2. Phase exponentielle.....	11
1.6.1. 3. Phase stationnaire.....	11
1.6.1. 4. Phase létale.....	11
1.6.2. Contrôle du développement algal.....	12
1.6.2.1. Méthodes directes.....	12
1.6.2.2. Méthodes indirectes.....	12
CHAPITRE 2: Matériels et méthodes	
2. Matériels et méthodes.....	14
2.1. Souches de micro-algues.....	14
2.2. Milieu de culture.....	14

2.2.1. Milieu de PROVASOLI f/2.....	15
2.3. Cultures souches et mères.....	17
2.3.1. Cultures souches.....	17
2.3.2. Culture mère.....	17
2.4. Mode de culture.....	17
2.4.1. Maitrise de la culture des micro-algues à des volumes intermédiaires.....	18
2.5. Méthode d'inoculation et repiquage.....	19
2.6. Conditions générale de culture.....	20
2.6.1. Lumière.....	20
2.6.2. Température.....	20
2.6.3. Dioxyde de carbone.....	20
2.6.4. Sels minéraux.....	21
2.6.5. Asepsie.....	21
2.7. Suivi de densités des cultures.....	21
2.8. Comptage cellulaire.....	22
2.8.1. Mode opératoires.....	22
2.8.2. Technique de comptage.....	22
2.9. Estimation de taille des espèces.....	23
2.10. Logiciel "Tsviiew".....	23

CHAPITRE 3: Résultats et discussion

3. Résultats et discussion	25
3.1. Résultats	25
3.1.1. Suivi de la culture de <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	25
3.1.1.1. Croissance de <i>Phaeodactylumtricornutum</i>	25
3.1.2. Suivi de la culture de <i>Tetraselmis suecica</i>	26
3.1.2.1. Croissance de <i>Tétraselmis suecica</i>	27
3.1.2.2. Absorbance de <i>Tetraselmis suecica</i>	28
3.1.2.3. Courbe d'étalonnage de <i>Tetraselmis suecica</i>	29
3.2. Discussion.....	30
3.2.1. <i>Phaeodactylumtricornutum</i>	30
3.2.2. <i>Tétraselmis suecica</i>	31

Conclusion	34
-------------------------	----

Références bibliographiques

Annexes.

Liste des figures :

Figure1 : Morphologie de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> . (G100X10).....	5
Figure2 : Morphologie de <i>T. suecica</i> . (G100X10).....	6
Figure3 : Processus de culture algale montrant les différents intrants nécessaires.....	9
Figure4 : Courbe de croissance des micro-algues montrant les différentes phases de culture.....	11
Figure5 : Souche de <i>Tetraselmis suecica</i> et <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	14
Figure6 : Préparation du milieu F/2.....	15
Figure7 : Etapes d'inoculation et repiquage de <i>Tetraselmis suecica</i>	19
Figure8 : Cellule Malassez.....	21
Figure9 : Microscope optique.....	21
Figure10 : Compteur manuel.....	21
Figure11 : Spectrophotomètre (JENWAY .6405 UV/VIS).....	22
Figure12 : Principe de fonctionnement du logiciel "Tsview" version 6.1.3.9.....	23
Figure13 : <i>Phaeodactylum tricornutum</i> A(40X10) B (100X10).....	25
Figure14 : Courbe de Croissance de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> dansle milieu F/2 PROVASOLI.....	26
Figure15 : <i>Tétraselmis suecica</i> A(40X100) B (100X10).....	26
Figure16 : Courbe de croissance de <i>Tetraselmis suecica</i> dans le milieu F/2 Provasoli.....	27
Figure17 : Variation des absorbances de <i>Tetraselmis suecica</i> en fonction du temps.....	28
Figure18 : Courbe d'étalonnage de <i>Tetraselmis suecica</i>	29

Liste des tableaux :

Tableau I :Volume cellulaire, poids organique et composition en lipides de certaines espèces d'algues.....	4
Tableau II : Analyse biochimique en pourcentage du poids sec de quelques algues unicellulaire.....	9
Tableau III : Comparaison des résultats de <i>Phaeodactylum tricorutum</i> avec les résultats des autres auteurs..	31
Tableau IV. Comparaison des résultats de <i>Tétraselmis suecica</i> avec les résultats des autres auteurs.....	32
Tableau V: caractéristiques des principales cellules de comptage	Annexe.3
Tableau VI :variation de la concentration cellulaire de <i>Phaeodactylum tricorutum</i> en fonction de temps.....	Annexe.5
Tableau VII : variation de la concentration cellulaire de <i>Tétraselmis suecica</i> en fonction de temps...	Annexe.5
Tableau VIII : variation de la densité optique de <i>Tétraselmis suecica</i> en fonction de temps.....	Annexe .5

Introduction

Introduction

L'algoculture désigne la culture en masse d'algues dans un but industriel et commercial. Ce domaine concerne aussi bien les micro-algues que les macro-algues. Le but de cette activité aquacole est de produire aussi bien des aliments (pour la consommation humaine ou comme algues fourrages), des compléments alimentaires, des produits vétérinaires et pharmaceutiques, des cosmétiques, des matières bioplastiques ou encore des sources d'énergies renouvelables. Aujourd'hui, il y a un grand nombre d'espèces d'algues qui sont recensés dont la majorité sont des micro-algues. Ces algues ont colonisé aussi bien les milieux marins que d'eau douce ou bien encore terrestres ce qui en fait des organismes adaptés à un grand nombre de conditions environnementales. Cette large diversité laisse entrevoir de nombreuses possibilités quant à leur utilisation. Malgré cette diversité, une dizaine d'espèces de micro-algues sont cultivées à une échelle industrielle. Aujourd'hui, le marché mondial de la biomasse algale est en constante expansion.

Les premières installations industrielles de culture de micro-algues ont vu le jour au Japon en 1960 pour la culture de *Chlorella vulgaris*. La culture des micro-algues a fait l'objet de nombreux travaux, Provasoli (1957) dans le développement des milieux de cultures artificiels, Berland (1966) sur l'étude de la culture des diatomées. En Algérie, Bechagra (1996) a fait une étude sur la croissance de deux espèces de micro-algues dans deux milieux de culture différents pour *Chlorella sp* et *Tetraselmis suecica*, aussi Hadjadj (2002) sur un essai de culture de l'espèce de micro-algue *Chlorella sp* dans différents milieux de culture.

Le présent travail a été effectué au niveau du Centre national de recherche et du développement de la pêche et de l'aquaculture (CNRDPA) dans le cadre d'un projet de coopération Algero-Espagnol. Il représente une contribution à l'étude de la croissance de deux micro-algues utilisées en aquaculture, *Tetraselmis suecica* et *Phaeodactylum tricorutum*. Les cultures effectuées ont été réalisées à partir de souches maintenues sur milieux solide jusqu'à des volumes dits intermédiaires. Un suivi de la croissance avec ses différentes phases a été réalisé pour les deux espèces.

Le manuscrit est présenté en trois chapitres : le premier chapitre comprend une présentation des deux espèces étudiées, des informations sur leur écologie et répartition géographique. Le deuxième chapitre est consacré pour le matériel et méthodes utilisées dans ce travail. Le troisième chapitre porte sur les résultats et les discussions. La conclusion finale permet de relever les principaux points étudiés.

Chapitre I : Généralités

1. Généralités

Selon Gayral (1975), Manguin (1943) et Davis (1955) ; le terme d'algue comprend tous les thallophytes pourvus de chlorophylle, qu'ils soient marins ou d'eau douce. Les algues se divisent en trois groupes ou phylums, selon les caractères des pigments élaborés par les chlorophylles, il existe principalement les Chlorophytes, les Chrysophytes, les Rhodophytes et les Cyanobacters, ces derniers se caractérisent par l'absence de plaste et de noyau différenciés.

L'algoculture consiste à la production de micro-algues dans des conditions contrôlées et maîtrisées. Les micro-algues unicellulaires marines sont cultivées en éclosérie pour servir de nourriture aux coquillages d'intérêt commercial à différents stades de développement. (FAO, 2006)

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

Le tableau 01 représente une liste d'espèces communément utilisées en éclosérie de bivalves ainsi que les paramètres de tailles et de composition cellulaire. (FAO, 2006)

Tableau I: Volume cellulaire, poids organique et composition en lipides de certaines espèces d'algues, couramment utilisées comme nourriture pour alimenter les larves et naissain de bivalves.

Espèces:	Volume cellulaire moyen (μm^3)	Poids organique (μg 10-6 cells)	Lipides %
Flagellés:			
<i>Tetraselmis suecica</i>	300	200	6
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	170	85	21
<i>Isochrysis galbana</i> <i>Isochrysis</i> (T-ISO) <i>Pavlova lutherii</i>	40-50	19-24	20-24
Diatomées:			
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	35	7	17
<i>Chaetoceros gracilis</i>	80	30	19
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	45	22	24
<i>Skeletonema costatum</i>	85	29	13
<i>Phaeodactylum tricornerutum</i>	40	23	12

1.1. Systématique et morphologie

1.1.1. *Phaeodactylum tricornutum*

- **Systématique:** (Lewin.J. C., 1958)

Phylum: Ochrophyta

Embranchement: Chrysophyta

Classe: Bacillariophyceae

Ordre: Bacillariales

Famille: Phaeodactylaceae

Genre: *Phaeodactylum*

Espèces: *Phaeodactylum tricornutum*. Bohlin, 1897.

- Morphologie

C'est une diatomée unicellulaire, avec une trochophore pariétale à la région centrale. Deux formes typiques de cellules, ovales peuvent être mobiles avec des mouvements lents ou immobiles et fusiformes. (Lewin. J. C., 1958).



Figure 1. Morphologie de *Phaeodactylum tricornutum*. (G.100X10)

1.1.2. *Tetraselmis suecica*

Systematique: (Kylin *in* Bechagra, 1996)

Phylum: Chlorophyta

Embranchement: Chlorophycophyte

Classe: Parasinophycée

Ordre: Pyramimonadale

Famille: Pyramimonacée

Genre: Tetrasemis

Espèce: *Tetraselmis suecica* .Butcher1959.

Morphologie

Tetraselmis suecica est une micro-algue verte qui se caractérise par des cellules solitaires libres, mobiles, comprimées latéralement avec une base arrondie, possédant quatre flagelles de même taille, la paroi est lisse, rigide, pyrénolide et bien visible. (Bourrelly, 1990 *in* Bechagra, 1996).



Figure 02. Morphologie de *Tetraselmis suecica*. (G.100X10)

1.2. Ecologie générale

1.2.1. Lumière

La lumière joue un rôle essentiel dans la répartition verticale des micro-algues. Il existe pour chaque espèce une illumination maximale, minimale et optimale pour son développement (Belkoura & al, 1994).

1.2.2. Température

La température est l'un des facteurs les plus importants qui conditionnent la répartition géographique des micro-algues. (Gayral, 1975 *in* Hadjadji, 2002).

La majorité des espèces qui vivent près des côtes tolèrent des variations de température saisonnières de grande amplitude. Elles sont connues sous le nom d'Eurythermes. Quant aux espèces Sténotherme qui ne supportent qu'un faible échauffement ou refroidissement des eaux. (Alzieu, 1986).

1.2.3. Sels nutritifs

Les sels nutritifs peuvent limiter le taux de croissance chez les algues. Ainsi les besoins majeurs renferment le carbone, phosphate, azote, soufre, potassium et magnésium tandis que le fer et le manganèse sont assimilés en petite quantité.

Les éléments trace comme le Co, Zn, Cu, B et Mo, en plus des certaines substances organique (vitamines, acides nucléiques, facteurs de croissance) sont nécessaire pour les formes qui ont recours à l'hétérotrophie (Becker, 1994 *in* Hadjadji, 2002).

1.2.4. Salinité

La salinité est définie comme étant la teneur totale de l'eau en sels dissous, la salinité élevée dans la colonne d'eau est due à la présence du chlorure (Gayral, 1975).

Chaque espèce est caractérisée par ces variations de la salinité maximale, minimale ou optimale, selon leur résistance à la variation de la salinité; on distingue des algues Euryhalines qui résistent aux fortes variations de salinité et des algues Sténohalines résistant aux faibles variations (Le borgne, 1986).

1.2.5. PH

Le pH de l'eau de mer est alcalin, généralement voisin de 8,2, il subit de faible variation limité par le pouvoir tampon des sels d'acide faible, carbonate et hydrogencarbonate

La majorité des espèces tolèrent des variations de pH comprises entre 6 et 9 (Bernabe, 1989).

1.3. Répartition géographique

Les algues en général, ont toujours besoin d'eau, d'humidité, d'air, de lumière et de sels minéraux pour pouvoir se développer. Les micro-algues proprement dites ont presque une distribution universelle, dans les masses d'eau convenablement éclairées. (Davis, 1955) Selon Maheswari *et al* (2005), *Phaeodactylum tricornutum* et *tetraselmis suecica* ont une distribution en Europe du nord et en Amérique du nord.

1.4. Biologie

1.4.1. Reproduction

Il existe deux types de reproduction chez les micro-algues, reproduction sexuée et reproduction asexuée (Le borgne, 1985) :

a- Reproduction asexuée : les micro-algues se reproduisent soit par multiplication cellulaire chez les Cyanophycées et la mitose normale chez les Eucaryotes ; soit par la formation des cellules spécifique (Sporulation).

b- Reproduction sexuée : les micro-algues dans ce cas se reproduisent par l'interaction des gamètes de différentes sexualités (mâles et femelles) (Gayral, 1975).

1.4.2. Photosynthèse

Les micro-algues utilisent la lumière comme une source énergétique pour fabriquer leur propre substance à partir des sels nutritifs par photosynthèse (Jaques, 1975. Harris, 1978). La photosynthèse se fait selon l'équation ci-dessous :



La production de la matière organique ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) et la libération de l' O_2 sont les résultats de la photosynthèse (Bougis, 1974).

1.4.3. Valeur alimentaire

Les protéines, les hydrates de carbone et les lipides sont les constituants principaux des algues de culture. Il est noté que les espèces de très bonne qualité nutritionnelle sont fragiles en culture (Bernabe, 1991).

La valeur nutritive d'une algue est en fonction de sa composition chimique, celle-ci étant variable d'une espèce à une autre (voir tableau 2) (Audineau & *al*, 1986).

Tableau II. Analyse biochimique en pourcentage du poids sec de quelques algues unicellulaire. (Frank H. Hoff & Terry W. Snell, 1987).

Espèces	Protéines	Hydrates de Carbone	Lipides	Pigments	cendres
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	37	20.8	4.7	1.8	39
<i>Tetraselmis Suecica</i>	33	24	6.6	2.9	7.6

1.5. Culture des micro-algues

Les écloseries optent soit pour une culture intensive close avec éclairage artificiel installé dans des locaux séparés des autres installations, ou alors en plein air, quand il s'agit d'une culture extensive en bacs en grands volumes ou en étangs utilisant la lumière naturelle.

Un schéma du processus de culture phytoplanctonique est présenté dans la figure3 :

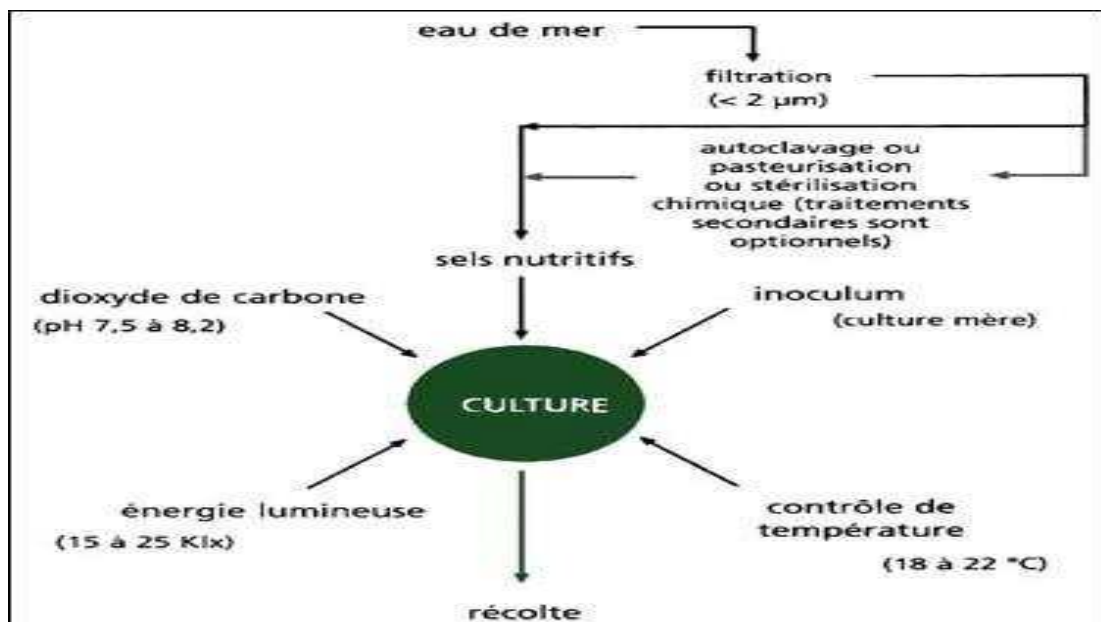


Figure 3. Processus de culture algale montrant les différents intrants nécessaires. Le besoin ou non d'un traitement secondaire d'eau de mer, dépend de l'état de filtration initiale de l'eau (FAO 2006).

1.5.1. Types de culture des micro-algues

Le but de la culture est l'obtention de petits volumes d'algues destinés à la nourriture des larves. Deux types de culture peuvent être utilisés en batch ou semi-continu (Helm.M & al, 2006):

a- Les cultures en batch: consistent à inoculer le milieu de culture avec l'espèce souhaitée. Les micros algues croissent rapidement jusqu'à ce que l'augmentation de la densité cellulaire commence à être inhibée par le manque de lumière due à une moins bonne pénétration dans la culture. Cette dernière est alors entièrement récoltée, le récipient lavé et stérilisé pour y réceptionner une nouvelle culture.

b- La méthode semi-continue: repose sur la même gestion des cultures mères mais au lieu de les récolter intégralement quand elles ont poussées, elles ne sont que partiellement récoltées avant leur limitation par la lumière. Le volume récolté est aussitôt remplacé par un même volume d'eau enrichi avec un milieu de culture fraîchement préparé. Le même processus est répété 2 à 3 jours plus tard et la durée de vie de la culture est ainsi prolongée. D'après (Helm M.M & al, 2006), pour certaines espèces tolérantes ou euryèces, par exemple, *Tetraselmis suecica*, les cultures peuvent être maintenues pendant 3 mois ou plus avec une récolte de 25 à 50 pour cent du volume de la culture 3 fois par semaine.

La culture en batch est généralement utilisée pour les espèces délicates et les diatomées à croissance rapide, alors que la culture semi-continue est utilisée principalement pour les espèces tolérantes de flagellés.

1.6. Croissance des micro-algues

1.6.1. Etapes de croissance des cultures:

Les étapes de la croissance d'une culture des micro-algues sont identiques à celles des bactéries. Il existe quatre phase essentielles ; phase de latence, phase exponentielle, phase stationnaire et phase létale (figure 4).

1.6.1. 1. Phase de latence

Elle correspond à l'adaptation des micro-algues aux nouvelles conditions de culture, cette phase peut être très courte (moins de 24h) (Le Borgne, 1986).

Plus la culture est âgée, plus la phase de latence est longue d'où la nécessité de repiqué la souche pendant la phase exponentielle (Helm & al, 1979).

1.6.1. 2. Phase exponentielle

En cette phase, la croissance est plus active, ainsi les cellules se divisent dans un temps caractéristiques, appelé “temps de division”.

Le développement de la population est exprimé par un taux de croissance de la forme:

$$N_1 = N_0 \exp (K_e \times t)$$

Où :

N_1 : le nombre de cellule au temps t_1 .

N_0 : le nombre de cellule au temps t_0 .

K_e : la constante de croissance.

Avec: $t = t_1 - t_0$

$$K_e = \frac{\ln N_1 - \ln N_0}{t_1 - t_0}$$

(Fiala, 1978)

1.6.1. 3. Phase stationnaire

Une phase où le nombre de cellule ne varie pratiquement pas, il peut y avoir une modification chimique du contenu cellulaire par suite vieillissement. Cette phase peut durer plusieurs semaines s’il n’y a pas de contamination (Le borgne, 1986).

1.6.1. 4. Phase létale

Après un arrêt total des divisions cellulaires; les cellules qui meurent ne sont pas remplacées (Fernandez-Reiriz & al, 1989).

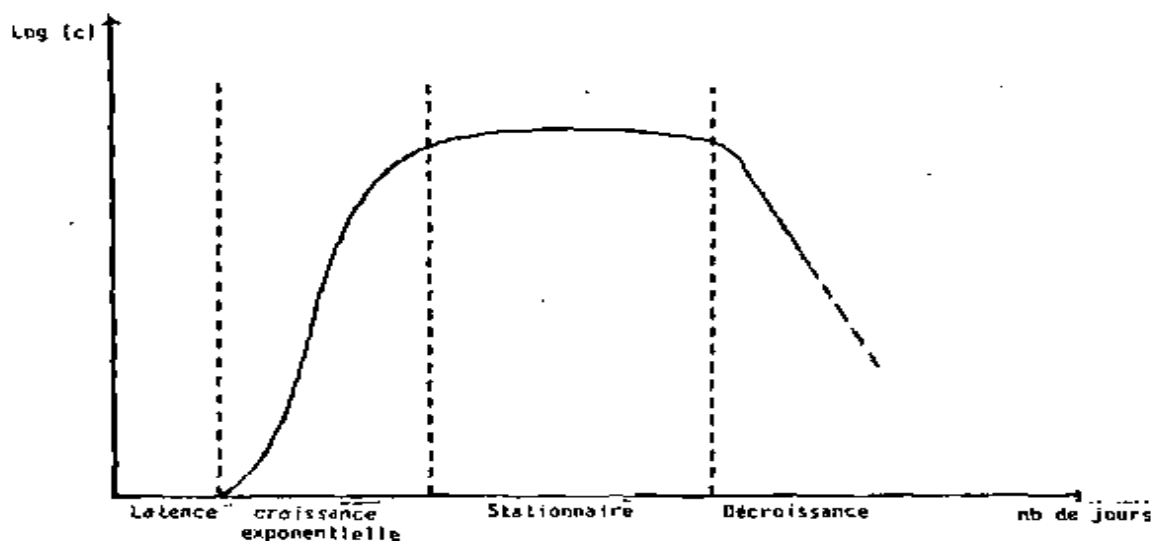


Figure 4. Courbe de croissance des micro-algues montrant les différentes phases de culture (A.Blancheton, 1986).

1.6.2. Contrôle du développement algal

La croissance d'une culture est généralement exprimée comme étant l'augmentation d'une biomasse, d'un nombre de cellule ou d'un taux de chlorophylle par unité de temps (*in* BECHAGRA.A & *al*, 1997)

Il est utile, voir indispensable de contrôler régulièrement le développement algal afin de déterminer le stade ou l'état physiologique, ce qui revient à déterminer la quantité des micros algues. Pour cela, il existe plusieurs moyens d'évaluation quantitative des cellules dans la culture.

Les méthodes d'évaluation de croissance peuvent être regroupées en:

1.6.2.1. Méthodes directes

- Par comptage ou numération au compteur de particules au microscope à l'aide d'une cellule de comptage.
- Par mesure de leur volume cellulaire après centrifugation. La mesure est facilitée si le fond des bols de centrifugation est long et étroit (LE BORGNE, 1978).
- Par le poids sec après centrifugation ou filtration d'un volume important, C'est précis pour comparer les cultures entre-elle (M.FIALA, 1979), mais le processus est long et ne permet pas un diagnostic rapide (JAQUE, 1978).

1.6.2.2. Méthodes indirectes

- Par mesure de la densité optique (Do), soit par mesure de la turbidité par photométrie ou de la chlorophylle par un spectrophotométrie (M.FIALA, 1979); On peut établir une correspondance entre la densité optique et la concentration cellulaire; une variation consiste à mesurer la teneur en chlorophylle (NEVEUX, 1978).
- Par mesure: des pigments, protéines, (ATP, CARBONE, Azote, etc.....).

Il est souvent nécessaire de connaître les variations du nombre de cellules. Ces numérations nécessitent des cellules ou des chambres de comptage.

Plusieurs types de celles ci existent, chacune d'elles fournissant une précision optimale pour une taille de cellule et une concentration donnée (FIALA, 1978, AUDINEAU & *al.*, 1986).

Le comptage s'effectue sous le microscope à l'aide d'une cellule de profondeur connue et dont le quadrillage défini dans un volume déterminé.

Chapitre II : Matériels et méthodes

2. Matériels et méthodes

2.1. Souches de micro-algues

Pour cette étude, deux espèces ont été utilisées, la Chlorophycée *Tetraselmis suecica*, et la Diatomée *Phaeodactylum tricornutum*. Ces espèces de micro-algues ont été offertes par l'équipe de recherche sur les mollusques de l'Institut Canarien des Sciences de la Mer (ICCM) dans le cadre d'un projet de coopération Algero-Espagnol (2009/2010).



Figure 5. Photos des Souches de *Tetraselmis suecica* et *Phaeodactylum tricornutum* maintenues sur milieu solide Agar-agar dans des boîtes de Petrie.

2.2. Milieu de culture

Les réactifs utilisés pour la préparation des milieux doivent être de pureté analytique reconnue. Deux types de milieux peuvent être utilisés:

a- Milieu à base d'eau de mer enrichie:

L'eau de mer ayant généralement des teneurs très faibles en éléments nutritifs, il est indispensable de l'enrichir pour permettre un bon développement des espèces cultivées.

Trois types d'éléments sont rajoutés:

- Les sels nutritifs majeurs comme le phosphate, le potassium et le magnésium.
- Les oligoéléments métalliques comme le cobalt et le manganèse.
- Les facteurs de croissance comme les Vitamines.

b- Milieux synthétiques:

La préparation et l'utilisation d'eau de mer ou d'eau douce reconstituée est possible à petite échelle, celle-ci est préparée avec l'eau distillée à laquelle les constituants majeurs sont rajoutés pour l'obtention d'une eau douce ou une eau de mer.

Il existe plusieurs milieux pour la culture des micro-algues. Le milieu de Walnes est utilisé pour la culture des micro-algues en eau de mer naturelle et artificielle, le milieu Conway

pour l'enrichissement de l'eau de mer naturelle et le milieu F/2 de Provasoli, pour la culture en eau de mer naturelle.

2.2.1. Milieu de PROVASOLI f/2

Le milieu de culture utilisé dans ce travail est le F/2 préparé comme indiqué dans le protocole ci-dessous, pour ce travail, la Vitamine H n'a pas été ajoutée. (Figure 06).

Milieu F2 PROVASOLI :

Solution I:

Nitrate de sodium (NaNO_3)	750 g
Qsp 10 litres d'eau déminéralisée	

Solution II :

Di-hydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4)	50 g
Qsp 10 litres d'eau déminéralisée	

Solution silicatée (pour les diatomées) :

Métasilicate de sodium ($\text{Na}_2\text{SiO}_3, 5\text{H}_2\text{O}$)	300 g
Qsp 10 litres d'eau déminéralisée	

Solution métallique:

Composition pour 10 litres :

Chlorure de fer hexahydraté ($\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$)	31,5 g
Acide Ethylènediamine tetraacétique de sodium (Na_2EDTA)	43,6 g
Sulfate de cuivre pentahydraté ($\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$)	10 ml d'une solution à 9,8 g/L
Molybdate de sodium dihydraté ($\text{Na}_2\text{MoO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$)	10 ml d'une solution à 6,3 g/L
Sulfate de zinc heptahydraté ($\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$)	10 ml d'une solution à 22 g/L
Chlorure de cobalt hexahydraté ($\text{CoSO}_4, 6\text{H}_2\text{O}$)	10 ml d'une solution à 10 g/L
Chlorure de manganèse tetrahydraté ($\text{MnCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$)	10 ml d'une solution à 180 g/L
Qsp 10 litres d'eau déminéralisée	

Solution vitaminique :

Composition pour 10 litres :

2 g de Thiamine (Vitamine B1)

10 ml d'une solution à 1 g/L de cyanocobalamine (Vitamine B12)

100 ml d'une solution à 0,1 g/L de biotine (Vitamine H)

Qsp 10 litre d'eau déminéralisée stérilisée

Solution à conserver au réfrigérateur

Utilisation :

Ce milieu est utilisé pour la culture des micro-algues en eau de mer naturelle.

Pour 1 litre d'eau de mer :

1 ml de solution I

1 ml de solution II

1 ml de solution métallique

0,5 ml de solution vitaminique

1 ml de solution silicatée pour les diatomées



Figure06. Préparation du milieu F/2.

2.3. Les cultures souches et mères

2.3.1. Cultures souches

Ce sont des algues monospécifiques utilisées pour fournir des cultures mères. Ces cultures sont maintenues dans des milieux de culture spécifiques comme le milieu de culture d'Erdschreiber, le milieu F/2, des géloses d'agar enrichi en nutriment en tubes à essai inclinés (Helm & *al*, 2006). Un repiquage régulier permet de garder des cellules jeunes avec un fort potentiel de croissance.

2.3.2. Culture mère

Une lignée de cultures mères est préparée à partir des cultures souches des espèces souhaitées. Ces cultures sont spécifiquement cultivées pour fournir un inoculum destiné à démarrer de grands volumes de cultures nécessaires à la production.

2.4. Mode de culture

Les souches sont maintenues séparément sous des conditions contrôlées de lumière et de température dans des boîtes de pétrie, et sont seulement utilisées pour inoculer les cultures mères quand c'est nécessaire. Elles ne sont ni aérées ni alimentées en dioxyde de carbone. Le nom des espèces, ainsi que la date du transfert, doivent être marqués sur les tubes au feutre indélébile. Les cultures mères sont obtenues et gardées auprès des lampes fluorescentes dans la salle de culture à une température de 18 à 22°C.

Une fois les souches choisies, elles sont repiquées à partir des boîtes de pétrie dans des tubes à essais de 10 ml dans des conditions stériles. Puis transférées dans des volumes de 100 ml qui à leur tour sont transférés dans des volumes de 500 ml. Le reste est utilisé comme inoculum pour des cultures de plus grands volumes jusqu'à 25 litres.

Les cultures mères (100 ml à 1 litre) sont cultivées rapidement pendant 7 à 14 jours à des températures et intensités lumineuses élevées avec un apport d'air enrichi en dioxyde de carbone (quant c'est possible) à partir des volumes de 500 ml. Quand la culture est prête, une aliquote est utilisée pour redémarrer une culture et la fraction principale permet d'initier une culture de volume intermédiaire.

2.4.1. Maitrise de la culture des micro-algues à des volumes intermédiaires

La majorité des laboratoires et écloseries qui ont besoin de petits volumes d'algues destinés à la nourriture utilisent des ballons en verre ou des bonbonnes en plastique transparent de volume variable pouvant atteindre 25 litres (des sacs en plastique transparent de volume de 15 litre ont été utilisés dans ce travail). Ils sont généralement utilisés la culture en «batch» ou semi-continu. Les cultures de volume intermédiaire (dans ce travail, elles variant entre 4 et 20 litres) peuvent être utilisées aussi bien pour nourrir les larves, que pour commencer les cultures en grand volume. Les cultures en grand volume sont généralement de 50 litres minimum et sont souvent bien plus importants.

2.5. Méthode d'inoculation et repiquage

Les différentes étapes de cultures de ce travail, sont présentées sous forme d'exemple en figure 07 pour la culture de *Tetraselmis suecica*.

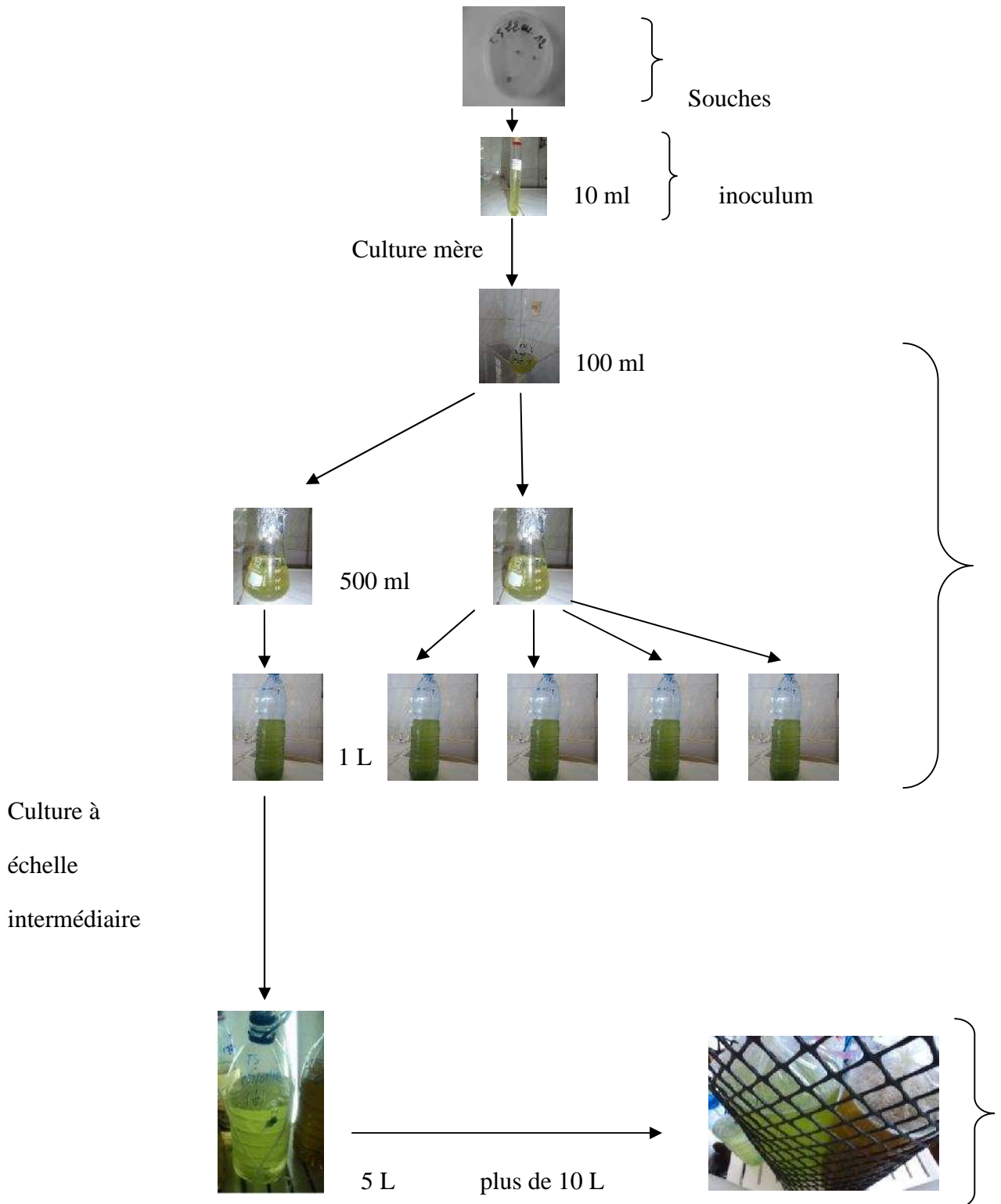


Figure 07. Etapes d'inoculation et repiquage de *Tetraselmis suecica*.

2.6. Conditions générale de culture

Pour pouvoir offrir aux micro-algues un milieu qui leur convienne parfaitement, il faut être au courant des conditions qui existent dans leur habitat naturelle, il faut donc réaliser un environnement physico-chimique qui favorise la croissance et la production.

2.6.1. Lumière

Les cultures reçoivent une lumière blanche artificielle type «Blanc industrie» 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.

2.6.2. Température

La climatisation de la salle d'algues maintient une température de 18 à 20°C. C'est la température moyenne qui correspond aux besoins des espèces phytoplanctoniques exploitées. Une température inférieure entraînerait un ralentissement du métabolisme des algues. Une température trop élevée provoquerait une altération de l'équipement enzymatique des cellules avec un développement incontrôlé de celles-ci. L'isolation thermique de la salle de culture limite les écarts de température en favorisant le maintien de la climatisation. Pour assurer la régulation thermique, une climatisation suffisamment puissante est nécessaire pour pallier le dégagement thermique du à l'éclairage et maintenir les températures moyenne qui satisfait les exigences des espèces cultivées.

2.6.3. Dioxyde de carbone

Pour une production phytoplanctonique intensive, le dioxyde de carbone contenu dans l'air pressé et filtré qui est diffusé dans la salle de culture est insuffisant. 1 à 2% de dioxyde de carbone sont alors adjoints à l'air pressé. La quantité de dioxyde de carbone est réglée grâce à un manomètre sur la bouteille de gaz. Le dioxyde de carbone a plusieurs fonctions dans la culture de phytoplancton comme la stabilisation du pH du milieu de culture. En effet, en solution, le dioxyde de carbone réagit avec l'eau et donne de l'acide carbonique qui s'ionise en bicarbonate. Le bicarbonate stabilise le pH (8.2).

2.6.4. Sels minéraux

Pour obtenir les concentrations optimales en phytoplancton pour la nutrition des animaux, les sels nutritifs présents dans l'eau de mer sont insuffisants. Il est donc nécessaire d'enrichir le milieu en nitrates, phosphates, métaux, oligo-éléments et vitamines. Dans le cas des diatomées, la silice est ajoutée pour la constitution de leur paroi cellulaire.

2.6.5. Asepsie

Il est important de travailler en conditions aseptiques pour obtenir une culture monospécifique de phytoplancton et éviter toute contamination, par des bactéries, du phytoplancton et des animaux qui vont consommer ce phytoplancton. De plus, la garantie d'une culture monospécifique permet un contrôle rigoureux de l'alimentation des animaux élevés notamment lors du conditionnement pour la reproduction de certains bivalves.

2.7. Suivi de densités des cultures

Les techniques de culture et de production algale ont été décrites par ailleurs. Les micro-algues sont maintenues sur milieu F/2 de Provasoli en ballon de 3 litres sous une intensité lumineuse de 3500 lux, à la température de 20°C. Pour chaque espèce, une culture a été suivie pendant une durée de quarante-cinq jours. Les valeurs obtenues ont permis l'établissement des courbes de croissance moyenne. Rappelons qu'en phase exponentielle, le taux journalier de division est égale a :

$$K_e = dN/N.dt$$

Où : N est la concentration cellulaire de la culture et t le temps.

Dans ce travail, la cellule Malassez (figure 08), un microscope optique (MOTIC.B1.Séries) (figure 09) et un compteur manuel (figure 10) ont été utilisés pour la méthode directe.



Figure 08. Cellule Malassez.



Figure 09. Microscope optique.



Figure 10. Compteur manuel.

Pour la méthode indirecte, un spectrophotomètre (JENWAY 6405. UV/VIS) (figure 11) a été utilisé.

Le spectrophotomètre mesure la chlorophylle *a* et mesure la pénétration de radiation d'une longueur d'onde de 540 nm, à travers l'échantillon continu dans une cuve de quartz. Pour établir une correspondance entre la densité optique et la concentration cellulaire.



Figure 11. Spectrophotomètre (JENWAY 6405. UV/VIS)

2.8. Comptage cellulaire

Différentes cellules de comptage de profondeur connue et dont le quadrillage défini donne un volume déterminé, peuvent être utilisées (voir annexe 03 tableau).

Pour cette étude le comptage de cellules phytoplanctoniques a été effectué avec la cellule malassez (voir Annexe 04)

2.8.1. Mode opératoires

La méthode de comptage cellulaire sous microscope droit à l'aide d'une cellule de Malassez s'est effectuée périodiquement, une goutte de la culture algale est prélevée à l'aide d'une pipette pasteur, stérilisée puis déposée sur la cellule de Malassez. Les espèces mobiles sont fixées au préalable par une goutte de formol 10% à une dose de 2 à 3 gouttes pour 20 ml de culture, cette préparation n'est pas nécessaire pour les algues statiques (diatomées). Une lamelle est déposée sur l'ensemble en évitant la formation des bulles d'air.

2.8.2. Technique de comptage

Une première observation au microscope a été effectuée à l'objectif (X100) pour la mise au point des cadres, mais le comptage a été effectué à grossissement (X40). À l'aide d'un compteur, le nombre de cellules par case est déterminé ce dernier est converti au nombre moyen de cellules par unité de volume. Le détail de la technique est démontré en annexe 04.

2.9. Estimation de taille des cellules

Pour estimer la taille des deux espèces *Tétraselmis suecica* et *Phaeodactylum tricornutum*. Plusieurs photos ont été prises périodiquement pour être mesurés à l'aide du logiciel "Tsview" version 6.1.3.9. Une centaine de cellules ont été mesurés pour avoir une longueur moyenne, un intervalle de confiance et un écart type à partir de programme de « l'Excel » pour chaque espèce.

2.10. Logiciel "Tsview"

TSView est le logiciel produit conçu en liaison avec microscope numérique de la série CMOS et CCD série. Avec les fonctions de la photo prise, l'image de mesure et de la manipulation. La photo est en haute clarté et vérifiés par rapport à une norme, de cette façon, on améliore sa précision. Offert par la manipulation d'image la fonction outils couvre une gamme comme suite: outil renouvelable, outil de réparation, affûter/obscurcissant outil, outil luminosité, couleur réglage outils et ainsi de suite.

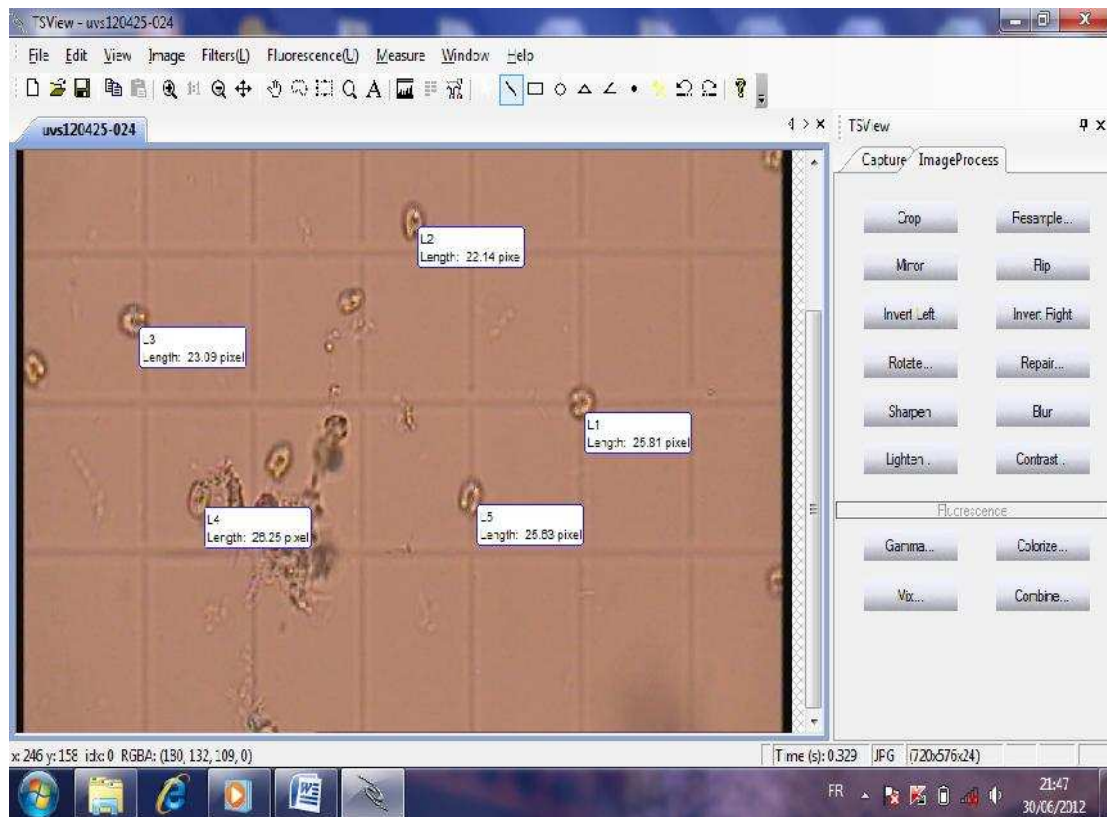


Figure 12. Principe de fonctionnement du logiciel "Tsview" version 6.1.3.9

Chapitre III: Résultats et discussion

3. Résultats et discussion

3.1. Résultats

3.1.1. Suivi de la culture de *Phaeodactylum tricornutum*

Les cellules de *Phaeodactylum tricornutum* (figure 13) sont fusiformes avec une longueur moyenne de $15,15 \mu\text{m} \pm 0,35$.



(A)



(B)

Figure 13. *Phaeodactylum tricornutum* .A(G.40X10) B (G.100X10)

3.1.1.1. Croissance de *Phaeodactylum tricornutum*

Le volume produit durant 60 jours est estimé à 30 litres repartis sur différents volumes de culture, variant de 500ml à 10 litres.

La figure 14 illustre la croissance de *Phaeodactylum tricornutum* qui passe rapidement d'une concentration de $3,56 \cdot 10^6$ cellule/ml à une concentration maximale de $12,8 \cdot 10^6$ cellule/ml dans les premiers 10 jours (tableau 3 de l'annexe 5). A partir du 11^{ème} jour, la phase stationnaire s'installe, une concentration moyenne de $9 \cdot 10^6$ cellule/ml est notée. Une phase de décroissance cellulaire est remarquée à partir du 33^{ème} jour.

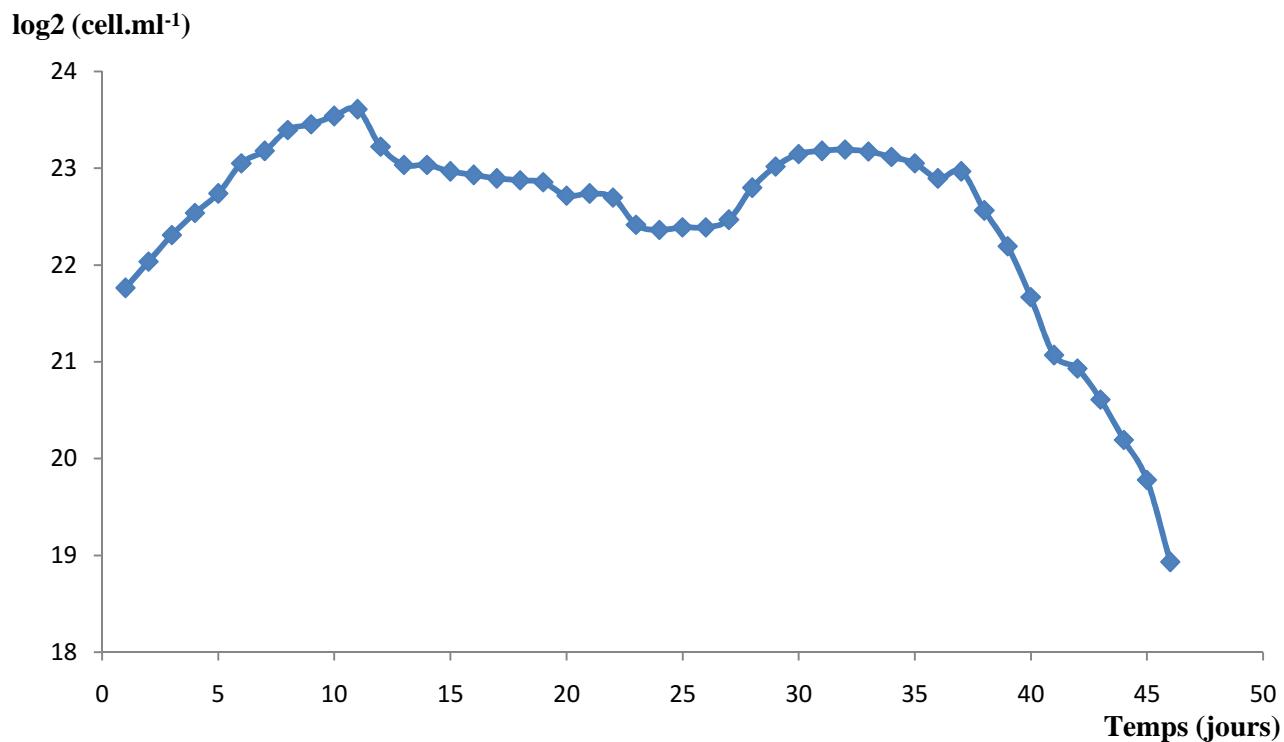


Figure 14. Courbe de croissance de *Phaeodactylum tricornutum* dans le milieu F/2 PROVASOLI.

3.1.2. Suivi de la culture de *Tetraselmis suecica*

Les cellules de *Tetraselmis suecica* (figure 15) ont une forme ovale de longueur moyenne de $12,79 \mu\text{m} \pm 0,34$.

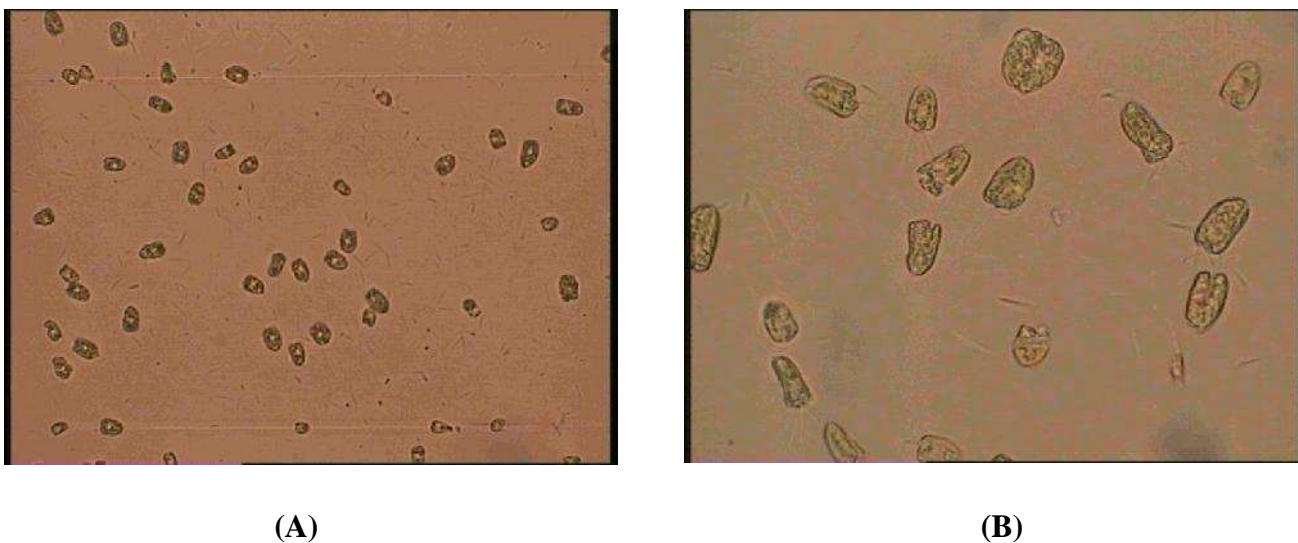


Figure 15. *Tetraselmis suecica*. A (G.40X10) B (G.100X10)

3.1.2.1. Croissance de *Tetraselmis suecica*

La quantité de *Tetraselmis suecica* produite est de 20 litres durant une période de 60 jours repartis sur différents volumes de culture, variant de 500ml à 25 litres.

Le graphe (figure 16) montre que *Tetraselmis suecica* a une phase exponentielle qui dure 10 jours. Durant cette phase, elle passe d'une concentration de $0,12 \cdot 10^6$ cellule/ml, à une concentration de $1,2 \cdot 10^6$ cellule/ml.

Une phase stationnaire apparaît à partir du 11^{ème} jour avec une durée de 28 jours, pendant laquelle deux chutes de concentration ont été remarquées à cause des conditions de culture. Une phase de décroissance est observée à partir du 38^{ème} jour (tableau2, annexe5).

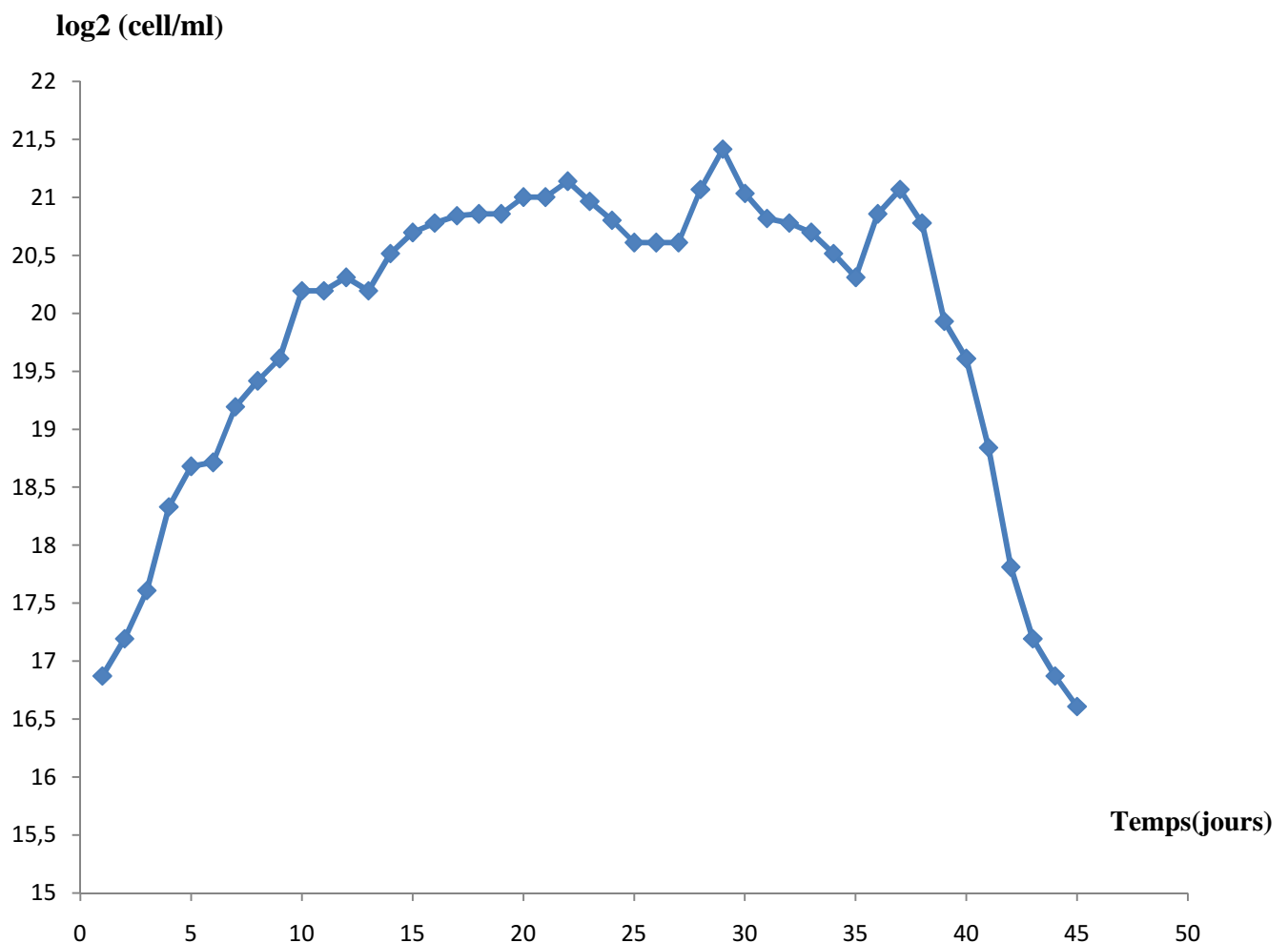


Figure 16. Courbe de croissance de *Tetraselmis suecica* dans le milieu F/2 Provasoli

3.1.2.2. Absorbance de *Tetraselmis suecica*

D'après le graphe de variation des absorbances de *Tetraselmis suecica* (figure 17), trois phases de croissance ont été observées. La phase exponentielle s'installe dès les premiers jours jusqu'à le 11^{ème} jour puis, une phase stationnaire avec une durée de 25 jours. La phase de décroissance commence à partir du 37^{ème} jour jusqu'à la fin de la durée de culture.

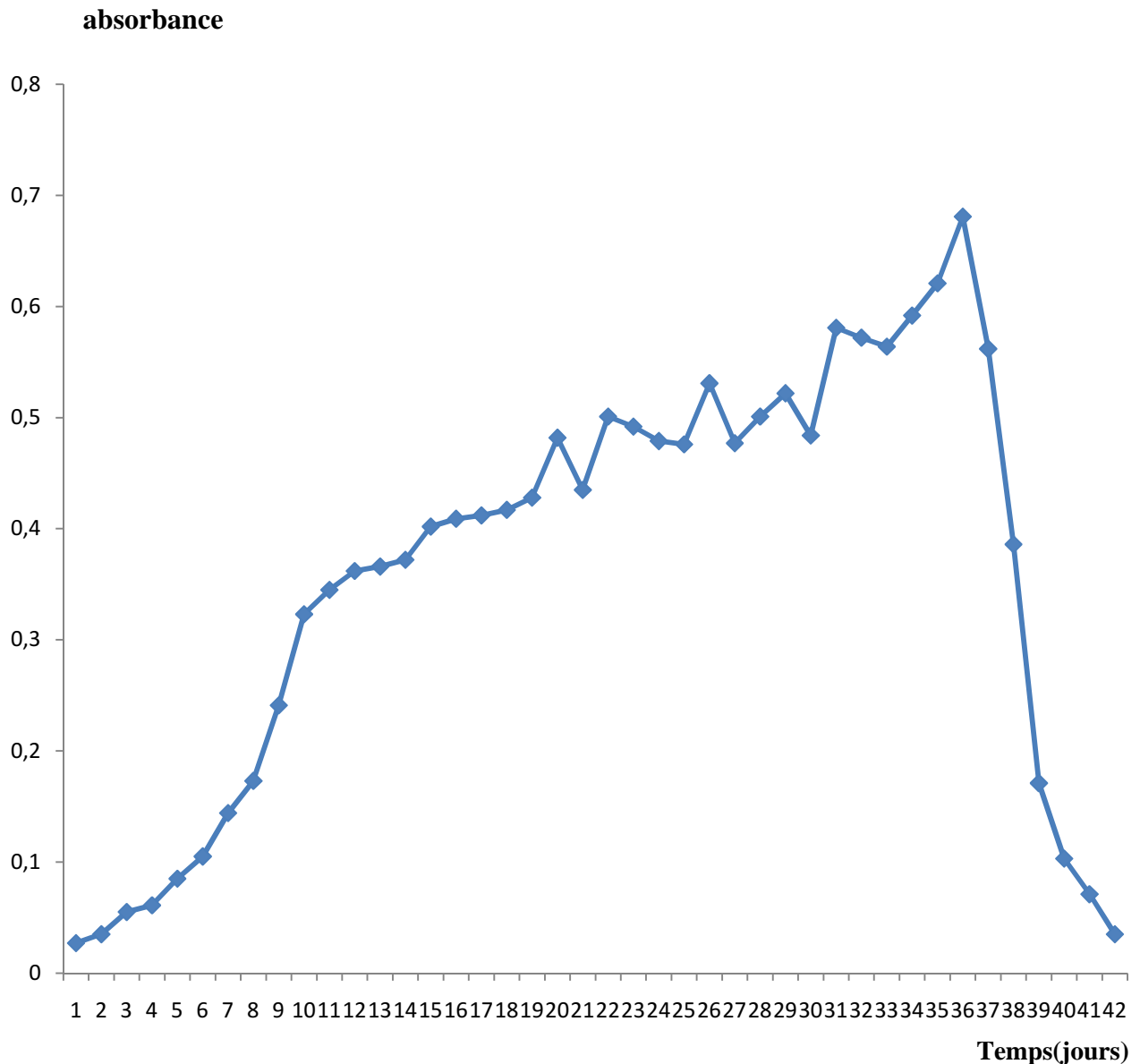


Figure 17. Variation des absorbances de *Tetraselmis suecica* en fonction du temps.

3.1.2.3. Courbe d'étalonnage de *Tetraselmis suecica*

D'après la courbe d'étalonnage de *Tetraselmis suecica* (figure 18), la relation linéaire entre l'absorbance et la concentration cellulaire est : $y = 3.10^{-7}x$. Donc, il est possible de déterminer la concentration cellulaire de *Tetraselmis suecica* à partir de l'absorbance.

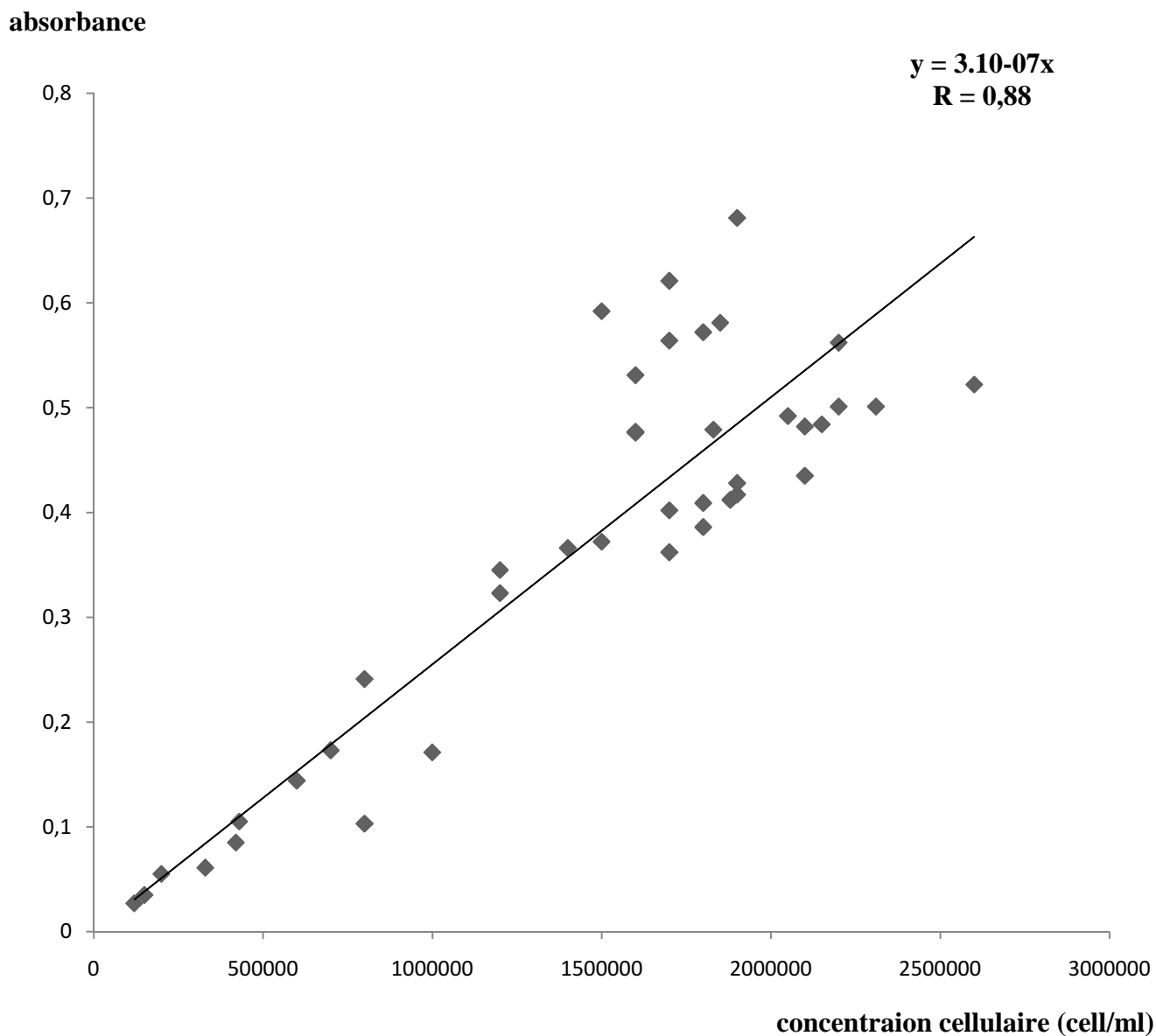


Figure 18. Courbe d'étalonnage de *Tetraselmis suecica*.

3.2. Discussion

3.2.1. *Phaeodactylum tricornutum*

La culture de *Phaeodactylum tricornutum* a duré 60 jours. Elle a atteint sa concentration maximale ($12,8 \times 10^6 \text{ cellule.mL}^{-1}$) (tableau 3) onze jours après repiquage. La concentration cellulaire de *Phaeodactylum tricornutum* obtenue dans ce travail par centrifugation est de $1,5 \text{ g.l}^{-1}$, c'est une valeur faible comparée au résultat obtenu par Garcia *et al* (2005) (tableau 3) avec une culture en batch où la concentration obtenue est de $3,5 \text{ g.l}^{-1}$, une densité de $2,4 \times 10^6 \text{ cellule.mL}^{-1}$ et un taux de division cellulaire quatre fois plus grand comparé au taux trouvé dans ce travail.

Andrew *et al* (1992) dans leurs travaux ont obtenu une densité cellulaire similaire à la densité obtenue par la présente étude (tableau 4) avec la moitié de durée de phase exponentielle et un taux de division plus important. Ces auteurs ont conclu que le système d'aération a une influence majeure sur la concentration cellulaire et sur les taux de croissance de *Phaeodactylum tricornutum* ce qui pourrait expliquer les différences entre les résultats.

Siron *et al* (1989) ont obtenu un taux de division dix fois plus grand au taux de division obtenu dans ce travail. Cependant la densité cellulaire est dix fois plus petite. En effet, selon ces mêmes auteurs l'augmentation des acides gras de *Phaeodactylum tricornutum* avec l'âge est liée au stockage de lipide dans des cellules quand l'assimilation de photosynthèse est effectuée tandis que la division cellulaire est bloquée à cause d'un manque nutritionnel.

Selon Masanori *et al* (2003), la diatomée *Phaeodactylum tricornutum* est bien développée à des températures de 25° à 30° et la condition de la salinité pour leur bonne croissance est de 10 à 40 ‰.

Phaeodactylum tricornutum présente un meilleur taux de division. Des concentrations supérieures à $12,8.10^6 \text{ cellules.ml}^{-1}$ sont obtenues en 11 jours de culture. Malgré les performances intéressantes de croissance, cette souche est assez fragile et exposée aux risques de contamination. Dans notre cas, Une chute de densité cellulaire a été observée le 12^{ème} jour durant la phase stationnaire à cause des conditions de culture.

Tableau 3. Comparaison des résultats de *Phaeodactylum tricornutum* avec les résultats des autres auteurs.

Auteurs	Densité maximale obtenue (cell.10 ⁶ .ml ⁻¹)	concentration cellulaire obtenue (g.l ⁻¹)	Taux de croissance r (cell.L ⁻¹ .jour ⁻¹)	Taux de division cellulaire K	Durée de la phase exponentielle (Jours)
Garcia <i>et al</i> (2005)	2,4	3,5	/	0,53	8
Andrew <i>et al</i> (1992)	12	/	1,58	/	5
Siron <i>et al</i> (1989)	1,2	/	/	1,21	8
Résultats personnel	12,8	1,5	0,11	0,12	10

3.2.2. *Tetraselmis suecica*

La densité de *Tetraselmis suecica* a atteint sa valeur maximale 28 jour après repiquage (2,8 x 10⁶cellule.mL⁻¹) (tableau 4) avec une concentration cellulaire de 0,33 g.l⁻¹ obtenue par centrifugation ; cultivée en eau de mer naturelle et une salinité ajusté à 25‰ enrichie par le milieu F/2 modifié. Les concentrations obtenues sont plus importantes comparées aux résultats obtenus par Leal *et al* (2005) où la concentration maximale obtenu est de 0,076 x 10⁶cellule.mL⁻¹, avec une concentration cellulaire de 0,1 g.l⁻¹ utilisant le même milieu de culture. Le taux de croissance obtenue dans ce travail est dix fois plus petit bien que la différence entre les deux durées de la phase exponentielle soit petite.

Aussi, les concentrations maximales obtenues par Luzmila *et al*(2007) (tableau 4) est faible comparée au présent travail. Cependant le taux de croissance est plus grand, la durée de la phase exponentielle qu'ils ont obtenue est presque deux fois plus petite que celle qu'on a obtenue. Les travaux de Luzmila *et al* (2007) ont été effectués dans une eau de faible salinité sans stérilisation et à une température de 20 °. La différence des résultats serait due aux conditions de culture différentes.

De même, les résultats obtenue par Vagi *et al* (2005) concernant la densité et la concentration cellulaire sont très faible comparés aux résultats de ce travail.

Les travaux de Robert *et al* (1987) utilisant un système de culture en Bach avec le milieu Conway aboutissent à des résultats différents de ceux du présent travail, avec un taux de division cellulaire plus important et une phase exponentielle de 13 jours.

Selon Monica *et al* (2002), *Tetraselmis suecica* est une micro-algue facile à cultiver, elle est très utilisable en aquaculture aussi elle présente une grande tolérance à la toxicité.

Tableau 03. Comparaison des résultats de *Tetraselmis suecica* avec les résultats des autres auteurs.

Auteurs	Densité maximale obtenue (cell.10⁶.ml⁻¹)	concentration cellulaire obtenue (g.l⁻¹)	Taux de croissance r (cell.L⁻¹.jour⁻¹)	Taux de division cellulaire K	Durée de la phase exponentielle (Jours)
Leal <i>et al</i> (2005)	0,076	0,1	0,51	/	8
Luzmila <i>et al</i> (2007)	0,60	/	0,73	/	4
Robert <i>et al</i> (1987)	/	/	/	0,23	13
Vagi <i>et al</i> (2005)	0,1	0,015	/	/	7
Résultats personnel	2,8	0,33	0,05	0,08	10

Conclusion

Conclusion

Conclusion :

La culture de phytoplancton est un travail rigoureux qui nécessite des précautions drastiques notamment pour le maintien des milieux en conditions aseptiques. La production de phytoplancton est coûteuse en main d'œuvre car elle doit faire l'objet d'un soin quotidien. La bonne qualité des cultures phytoplanctonique est la principale condition pour la réussite de l'élevage d'organismes marins consommateurs de ces algues. Les essais de culture des micro-algues réalisés ont permis de maîtriser les différentes techniques permettant une culture jusqu'à l'échelle intermédiaire.

L'utilisation du milieu Provasoli F/2 modifié pour la culture des micro-algues a permis d'avoir pour *Tétrahelminis suecica* et *Phaeodactylum tricornerutum* des densités de culture moyenne, l'utilisation d'un milieu F/2 plus complet donnerait de meilleurs rendements, alors que les conditions de culture n'étaient pas les plus favorables pour la croissance de l'algue. Une amélioration des conditions de culture comme l'utilisation de matériel plus développé avec un meilleur contrôle pourrait alors fournir de meilleurs résultats.

Pour un meilleur élevage larvaire, une production de micro-algues de qualité avec des quantités adéquates seraient un facteur clé pour la bonne croissance et la viabilité des larves. De nombreuses études restent à faire comme la compréhension des interactions entre les différents phénomènes relatifs à la cellule (métabolisation, excrétion) et l'optimisation des conditions de culture ainsi que l'étude biochimique de ces micro-algues. Sans une compréhension fine de ces phénomènes, il sera impossible de développer et maîtriser une culture des micro-algues.

Références bibliographiques

Bibliographie

- Alzieu. C.**, (1986). L'eau – milieu de culture in BERNABE. G., Aquaculture 1:15 - 41.
- Andrew. MC.,Johnston. M.,John.A.,Corbeu.,**(1992).Effet des taux d'aération sur les taux de croissance et l'abondance naturelle de *Phaeodactylum tricornutum*. Ed. Dundee DD1 4HN :194- 196.
- Audineau. P & Blancheton. G.**, (1986) .Production d'algues unicellulaires. Ifremer., Equipe Merea., station DEVA-SUD : 1 - 19.
- Bechagra.A & al.**, (1997). Culture de micro-algues. Mémoire d'études universitaire appliquée (D.E.U.A) en aquaculture I.S.M.A.L :35- 45.
- Bechagra.A.**, (1996). La culture des microalgues. Mémoire DEUA. Ismal : 42 p.
- Bernabé. G.**, (1989). Aquaculture (volume 1). Ed Lavoisier : 565p.
- Bernabé. G.**, (1991). Base biologique et écologique de l'aquaculture. Ed Lavoisier : 501p.
- Blancheton.A.**,(1985-86).Production d'Algues unicellulaires.IFREMER. Ed.comp:19 p.
- Bougis.P.**, (1974). Ecologie de plancton marine tome 1 : 196 p.
- Boulekraout & Zougar.**, (2006) .culture de micro algue. Mémoire d'étude universitaire appliquée (D.E.U.A) en aquaculture I.S.M.A.L :19- 37.
- Bourrelly. P.**, (1990). Les Algues d'eau douce, initiation à la systématique
1. Les algues vertes 1 :572 p.
- Davis.C.C.**, (1955). The marine and fresh water. Michigan Station University Press : 53-68.
- De billey. G.**, (1978) Culture en continue in, Jacque, G., Phytoplankton; biomasse Production, numération et culture. Ed. du castellet : 90 - 91.
- Fernandez, Rieriz. M.J., Perez-Camacho.A., Ferreiro. M.J., Blanco. J., Planas. M., Campos.M.J. & Labrata.U.**, (1989). Biomasse production and variation in the biochemical profile (Total protein, Carbohydrates, RNA, Lipids, and Fatty Acids) of seven species of marine microalgae. Ed.Arch. Aquaculture.83:17-37.

- Fernández., Sevilla. JM., Cerón., García. M.C., Sánchez., Mirón. A., Belarbi el H., García .,Camacho. F., Molina., Grima. E.,** (2004). Pilot-plant-scale outdoor mixotrophic cultures of *Phaeodactylum tricornutum* using glycerol in vertical bubble column and airlift photobioreactors: studies in fed-batch mode. Ed. Elsevier Science: 288 - 290 .
- Fiala. M.,** (1978).Culture d'algues. IN : Phytoplancton: Biomasse, production, numération et culture. Ed du castillet : 77-97.
- Frank. H., Hoff., Terry .W., Snell.,**(1987).Plankton culture manual; fifth Edition:159 p
IFREMER (2006).
- Gayral.P.,** (1975). Les algues, morphologie, cytologie, reproduction et écologie, DOIN éditeur : 165p.
- Hadjadji. N.,** (2002). Essai de culture de l'espèce de microalgue *Chlorella sp* dans différents milieu de culture. Mémoire DEUA. ISMAL:
- Harris. G. P.,** (1978). Photosynthesises, productivity and Growth: the physiology of phytoplankton. Erybnisse de limnologie. 10 : 1-163.
- Helm. M & Bourne. N & Lovatelli. A.,** (2006). Ecloserie de bivalves. Un manuel pratique. FAO Document technique sur les pêches. (comp. Ed.) : 184p.
- Helm. M., Laing. I & Jones. E.,** (1979). The development of a 200 L alga culture vessel at Conway. Ed. Fish.Res. Techn. Rep 53 : 1-12.
- Jacques. G.,** (1978).Phytoplancton; biomasse, production, numération et culture. Ed. Du castillet : 21-38.
- Leal. S.,Alfonso. E.,Curbilo. R.,**(2005). Utilisation d'une zeolithe cubbains de deux culture de micro-algues marines.Ed. Rev Invest :169 - 170.
- Le Borgne. Y.,** (1986).La culture des micro-algues in, BERNABE. G., Aquaculture. Ed. TEC& DOC-Lavoisier.1 :181-192.
- Lewin. J. C.,** (1958). The Taxonomic Position of *Phaeodactylum tricornutum*. Microbiol. Woods Hole Oceanographic Institution. Ed . Woods Hole, Mass., U.S.A : 427-432.
- Luzmila. R.,Juxamaita. J.,Vargas. J.,**(2005) .Effet de support sur le laboratoire de l'élevage des micro-algues marines. Applied Ecology, 6 (1.2).Ed. ISSN :112 p.
- Maheswari. U et al.** (2005). La base de données des diatomées *Nucleic Acids Research* Ed. EST : 344-347.

- Manguin. E & Viver. P.,** (1943).Les algues d'eau douce et leur intérêt en Pisciculture. Ed .Bull Française de pisciculture, premier année: 137-155.
- Masanori. O & Masaharu .T.,** (2003)Valeur trophique de la diatomées unicellulaires *Phaeodactylum tricornutum* de larves de crevettes Kuruma, *Penaeus Japonicus*. Ed. Invest. Min: 295p.
- Mekkid. A Yahia-Cheikh. I.Z.,** (1994).La culture des micro-algues
Mémoire d'études universitaires appliquées (D.E.U.A) en aquaculture
I.S.M.A.L :7-13.
- Monica. P.,Rama., Julio .A., Herrero. L., Enrique.Torres. V.,** (2002) .Cadmium removal by living cells of the marine microalgae *Tetraselmis suecica*. Ed. Arch: 111p.
- Muller-Feuga. A.,** (1997). Micro-algues ,enjeux de la recherche. IFREMER : 35p.
- Neveux. J.,** (1978). Biomasse in, Jacques. G., Phytoplancton; biomasse, production, numération et culture. Ed.Du castillet :21-38.
- Provasoli. L., Mclaughlin. J.J.A., & Droop. M. R.,** (1957).The development of artificial media for marine algae. Ed. Arch. Microbiol. 25 : 392 - 428.
- Robert. R & Trintignac. P.,** (1997). Microalgues et nutrition larvaire en écloserie de mollusques. Société Française de Malacologie. Ed. Haliotis 26 : 1-13
- Robert. R & His .E.,** (1987) .Croissance et spectre de taille de six micro-algues utilisées pour la nutrition de larves de bivalves en écloserie en aquaculture non renouvelée. Ed. Haliotis :35 p.
- Robert. S., Gerard., Brigitte . E.,** (1989). Changes in the fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum* and *Dunaliella tertiolecta* during growth and under phosphorus deficiency. Ed. inecology progress series: 97-98.
- Siron. R.,Giusti. G.,Berland. B.,**(1989).Changes in the fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum* and *Dunaliella tertiolecta* during growth and under phosphorus deficiency. Ed. Microbiol: 689- 694.
- Spencer. C. P.,** (1954). Studies on the culture of a marine diatom. J. Mar. Ed. Biol. Ass U. K., 33: 265-290.
- Vagi. MC.,Kostopoulou. MN.,Rasouli. CH.,Lalousi. ME.,**(2005) .Toxicité des pesticides organophosphorés à l'algue marine.Ed. NEST mondiale :124 p.
- Venkataraman. G. S.,** (1969).The cultivation of algae. Indian council of agricultural Research. Ed. ECAR: 237- 245.

Site internet : <http://www.aquoa.net/>
<http://www.ac-limoges.fr/svt/IMG/rtf/doc-12>
www.fao.org
www.wikidoc.org

Annexe 01

Les différents milieux de cultures utilisés pour la culture des microalgues

Milieu Walnes.

Solution principale :

Composition pour 10 litres :

Nitrate de sodium (NaNO_3)	680 g
Di-hydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4)	200 g
Acide Ethylènediamine tetraacétique de sodium (Na_2EDTA)	400 g
Acide borique (H_3BO_3)	20 g
Solution métallique	800 ml
Seawater solution	40 ml

Qsp 10 litres d'eau déminéralisée

Solution métallique :

Composition pour 10 litres :

Chlorure de fer hexahydraté ($\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$)	213,2 g
Sulfate de manganèse monohydraté ($\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$)	15,0 g
Sulfate de zinc (ZnSO_4)	2,5 g
Sulfate de cuivre pentahydraté ($\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$)	2,0 g
Sulfate de cobalt heptahydraté ($\text{CoSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$)	0,26 g soit 26 ml de Solution a
Molybdate de sodium dihydraté ($\text{Na}_2\text{Mo}_4, 2\text{H}_2\text{O}$)	0,14 g soit 14 ml de solution b
Fluorure de sodium (NaF)	0,10 g soit 10 ml de solution c

Solutions a, b et c : 1 g de chaque produit respectif qsp 100 ml d'eau déminéralisée.

Seawater solution :

Composition pour 500 ml :

Bromure de potassium (KBr)	32,5 g
Chlorure de strontium ($\text{SrCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$)	6,5 g
Chlorure d'aluminium ($\text{AlCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$)	0,25 g soit 25 ml de solution d
Chlorure de rubidium (RbCl)	0,1 g soit 10 ml de solution e
Chlorure de lithium ($\text{LiCl}, \text{H}_2\text{O}$)	0,05 g soit 5 ml de solution f
Iodure de potassium (KI)	0,025 g soit 2,5 ml de solution g

Solutions d, e, f et g : 1 g de chaque produit respectif qsp 100 ml d'eau déminéralisée.

Utilisation :

Ce milieu est utilisé pour la culture des micro-algues en eau de mer naturelle et artificielle.

Pour 1 litre d'eau de mer :

- 2 ml de solution principale
- 0,2 ml de solution vitaminique
- 2,5 ml de solution silicatée (cf milieu de Conway) pour les diatomées

Milieu Conway.**Solution principale:**

Composition pour 10 litres :

Nitrate de sodium (NaNO ₃)	1000 g
Di-hydrogénophosphate de sodium (NaH ₂ PO ₄)	200 g
Acide Ethylènediamine tetraacétique de sodium (Na ₂ EDTA)	450 g
Acide borique (H ₃ BO ₃)	336 g
Chlorure de manganèse (MnCl ₂)	3,6 g
Chlorure ferrique (FeCl ₃)	13 g
Solution métallique	10 ml
Qsp 10 litres d'eau déminéralisée	

Solution Metallique :

Composition pour 1 litre :

Chlorure de zinc (ZnCl ₂)	21 g
Chlorure de cobalt hexahydraté (CoCl ₂ , 6H ₂ O)	20 g
Sulfate de cuivre pentahydraté (CuSO ₄ , 5H ₂ O)	20 g
Ammonium heptamolybdate tetrahydraté (6(NH ₄) Mo ₇ O ₂₄ , 4H ₂ O)	09 g
Qsp 1 litre d'eau déminéralisée	

Solution Vitaminique :

Composition pour 1 litre :

- 2 g de Thiamine (Vitamine B1)
- 0,1 g de cyanocobalamine (Vitamine B12)

Qsp 1 litre d'eau déminéralisée stérilisée

Solution à conserver au réfrigérateur

Solution Silicatee (pour les diatomées) :

Composition pour 1 litre :

40 g de métasilicate de sodium ($\text{Na}_2\text{SiO}_3, 5\text{H}_2\text{O}$)

Qsp 1 litre d'eau déminéralisée

Utilisation:

Ce milieu est utilisé pour la culture des micro-algues en eau de mer naturelle.

Pour 1 litre d'eau de mer :

1 ml de solution principale

0,1 ml de solution vitaminique

2,5 ml de solution silicatée pour les diatomées

Milieu F2 Provasoli.

Solution I:

Nitrate de sodium (NaNO_3) 750 g

Qsp 10 litres d'eau déminéralisée

Solution II :

Di-hydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4) 50 g

Qsp 10 litres d'eau déminéralisée

Solution silicatée (pour les diatomées) :

Métasilicate de sodium ($\text{Na}_2\text{SiO}_3, 5\text{H}_2\text{O}$) 300 g

Qsp 10 litres d'eau déminéralisée

Solution métallique:

Composition pour 10 litres :

Chlorure de fer hexahydraté ($\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$) 31,5 g

Acide Ethylènediamine tetraacétique de sodium (Na_2EDTA) 43,6 g

Sulfate de cuivre pentahydraté ($\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$) 10 ml d'une solution à 9,8 g/L

Molybdate de sodium dihydraté ($\text{Na}_2\text{MoO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$) 10 ml d'une solution à 6,3 g/L

Sulfate de zinc heptahydraté ($\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$) 10 ml d'une solution à 22 g/L

Chlorure de cobalt hexahydraté ($\text{CoSO}_4, 6\text{H}_2\text{O}$) 10 ml d'une solution à 10 g/L

Chlorure de manganèse tetrahydraté ($\text{MnCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$) 10 ml d'une solution à 180 g/L

Qsp 10 litres d'eau déminéralisée

Solution vitaminique :

Composition pour 10 litres :

2 g de Thiamine (Vitamine B1)

10 ml d'une solution à 1 g/L de cyanocobalamine (Vitamine B12)

100 ml d'une solution à 0,1 g/L de biotine (Vitamine H)

Qsp 10 litre d'eau déminéralisée stérilisée

Solution à conserver au réfrigérateur

Utilisation :

Ce milieu est utilisé pour la culture des micro-algues en eau de mer naturelle.

Pour 1 litre d'eau de mer :

1 ml de solution I

1 ml de solution II

1 ml de solution métallique

0,5 ml de solution vitaminique

1 ml de solution silicatée pour les diatomées

Annexe 02

Matériel nécessaire pour la culture des microalgues :

- . Eau de mer filtrée stérilisée
- . Eau douce pour ajuster la salinité
- . Une pompe à vide pour le pré filtration de l'eau
- . Des filtres de 0,45 μm
- . Tubes à essais pour l'inoculation
- . Des erlenmeyers de différents volumes (250 ml, 500 ml, 1000 ml) et des bouteilles de 5litre pour les cultures intermédiaires.
- . Des pipettes
- . Autoclave pour la stérilisation de l'eau, des erlenmeyers, des tubes à essais et des pipettes
- . Bec benzène et une bouteille de gaz pour assurer les conditions de stérilité
- . Milieu de culture F/2
- . Papier aluminium et para filme
- . Des aérateurs pour apporter les gazes nécessaires aux cultures algales
- . Des cellules malassez, nageote pour le comptage journalier des micros algues
- . Un microscope

Annexe 03

Tableau IV : caractéristiques des principales cellules de comptage (Blancheton. A, 1985)

Type de cellule	Dimension de quadrillage L × T × p (mm)	Volume (ml)
Thoma	1 × 1 × 0.1	10 ⁻⁴
Agasse Lafont	1 × 1 × 0.1	10 ⁻⁴
Neubauer et Neubauer modifié	3 × 3 × 0.1	9.10 ⁻⁴
Mallassez	2,5 × 2 × 0.2	10 ⁻³
Fuchs Rosenthal	4 × 4 × 0.2	32.10 ⁻⁴
Agasse Lafont B	5 × 4 × 0.5	10 ⁻²
Lemaur	10 × 10 × 0.4	4.10 ⁻²
Nageotte	10 × 10 × 0.5	5.10 ⁻²

Annexe04

Description de la cellule malassez

C'est est une lame spéciale quadrillée de volume connu. Elle est composé de cases qui, chacune, possède 4 lignes et 5 colonnes. Qui permet le comptage de différents types de cellules.

Le volume d'une case est de:

$$0,2 \times 0,25 \times 0,2 = 0,01 \text{ mm}^3 = 10^{-5} \text{ ml}$$

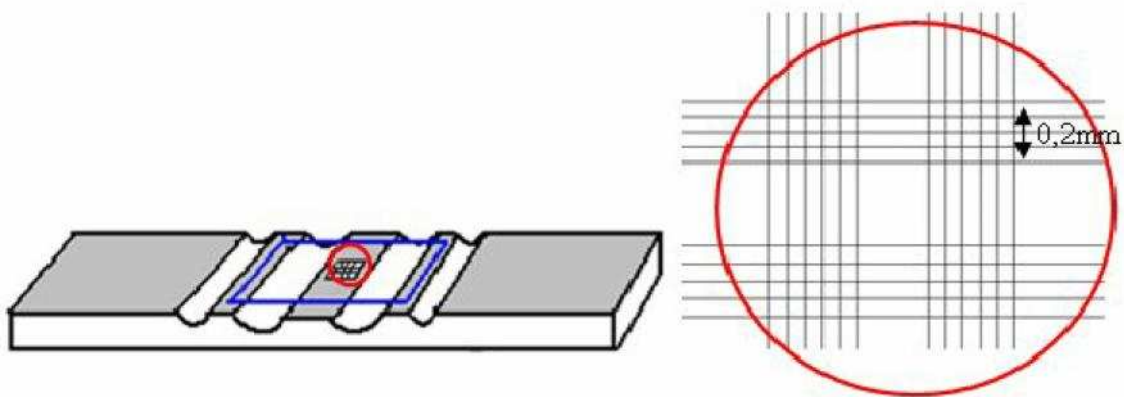


Figure 9: cellule malassez.

Remplissage de la cellule malassez

1. Prélever un échantillon de culture.
2. Homogénéiser l'échantillon.
3. fixer avec du formole (2gouttes dans 1ml) les micros algues flagellées.
4. Humidifier les parties extérieures à la lamelle. Déposer la lamelle sur la cellule de Malassez faire adhérer la lamelle a la lame en faisant glisser plusieurs fois la lamelle sur la lame.
5. Déposer l'échantillon sur le bord de la lame à l'aide d'une pipette pasteur – le liquide remplit alors la cellule par capillarité ; le comptage des algues mobile, les flagellés notamment, n'est possible que si elle sont tuées, pour se faire on rajoute une goutte de formole dans l'échantillon a compter
6. Mettre la lame au microscope.

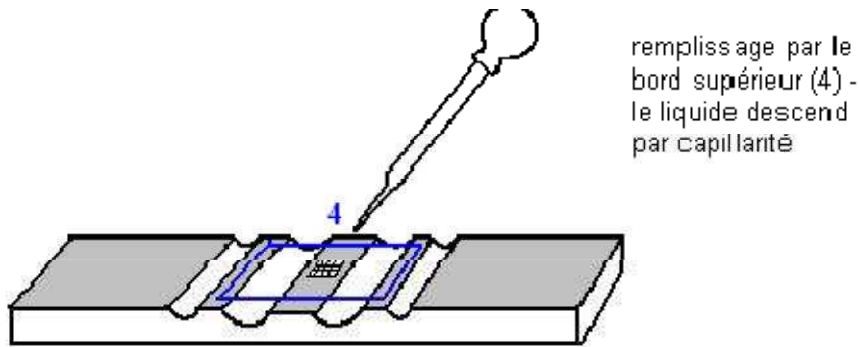
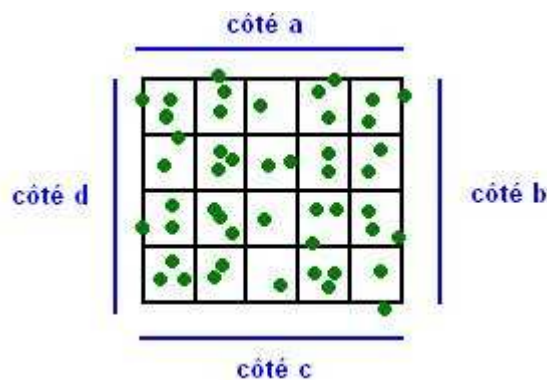


Figure 6: technique de remplissage de la cellule malassez

Dénombrement :

1. Faire une première mise au point à l'objectif x10 ;
2. Passez au grossissement x40 et faire la mise au point. Le quadrillage doit être bien visible.
3. Compter le nombre de cellules pour 5 cases.

Attention : pour les cellules positionnées sur les bords, on ne compte que celles situées sur 2 des 4 côtés de la case, par exemple, on compte les cellules sur les côtés a et (b), mais pas sur (c) ni (d).



Comment calculer le nombre moyen de cellules par case :

Exemple le nombre de cellules moyen par case = $225 : 5 = 45$

On a 45 cellules par 1 case

Soit : 45 cellules par 10⁻⁵ ml

5. Calculer la concentration cellulaire en cellules par ml :

45 cellules \longrightarrow 10⁻⁵ ml

[c] cellules \longrightarrow 1 ml

$[C] = (45 \times 1) / 10^{-5} = 45 \times 10^5 = \mathbf{4,5 \cdot 10^6 \text{ cellules/ml}}$

Annexe 05

Tableau V: variation de la concentration cellulaire de *Phaeodactylum tricornutum* exprimée en nombre de cellule/ml, et en Log2 (nombre de cellule/ml) en fonction de temps dans le milieu F/2 PROVASOLI.

N° de jours	dates	Nombre de cellules/ml.10 ³
1	10/05/2012	3560
2	11/05/2012	4300
3	12/05/2012	5200
4	13/05/2012	6100
5	14/05/2012	7000
6	15/05/2012	8700
7	16/05/2012	9500
8	17/05/2012	11040
9	18/05/2012	11500
10	19/05/2012	12200
11	20/05/2012	12800
12	21/05/2012	9800
13	22/05/2012	9700
14	23/05/2012	8600
15	24/05/2012	8200
16	25/05/2012	8000
17	26/05/2012	7800
18	27/05/2012	7700
19	28/05/2012	7600
20	29/05/2012	6900
21	30/05/2012	7000
22	31/05/2012	6800
23	01/06/2012	5600
24	02/06/2012	5400
25	03/06/2012	5500
26	04/06/2012	5500
27	05/06/2012	5800
28	06/06/2012	7300
29	07/06/2012	8500
30	08/06/2012	9300
31	09/06/2012	9500
32	10/06/2012	9600
33	11/06/2012	9460
34	12/06/2012	9100
35	13/06/2012	8700
36	14/06/2012	7800
37	15/06/2012	8200
38	16/06/2012	6200

39	17/06/2012	4800
40	18/06/2012	3330
41	19/06/2012	2200
42	20/06/2012	2000
43	21/06/2012	1600
44	22/06/2012	1200
45	23/06/2012	900

TableauVI : variation de la concentration cellulaire de *Tetraselmis suecica* exprimée en nombre de cellule/ml, et en Log2 (nombre de cellule/ml) en fonction de temps dans le milieu F/2 Provasoli.

N° de jours	dates	Nombre de cellules/ml.10 ³
1	10/05/2012	120
2	11/05/2012	150
3	12/05/2012	200
4	13/05/2012	330
5	14/05/2012	420
6	15/05/2012	430
7	16/05/2012	600
8	17/05/2012	700
9	18/05/2012	800
10	19/05/2012	1200
11	20/05/2012	1200
12	21/05/2012	1300
13	22/05/2012	1200
14	23/05/2012	1500
15	24/05/2012	1700
16	25/05/2012	1800
17	26/05/2012	1880
18	27/05/2012	1900
19	28/05/2012	1900
20	29/05/2012	2100
21	30/05/2012	2100
22	31/05/2012	2310
23	01/06/2012	2050
24	02/06/2012	1830
25	03/06/2012	1600
26	04/06/2012	1600
27	05/06/2012	1600
28	06/06/2012	2200
29	07/06/2012	2800

30	08/06/2012	2150
31	09/06/2012	1850
32	10/06/2012	1800
33	11/06/2012	1700
34	12/06/2012	1500
35	13/06/2012	1300
36	14/06/2012	1900
37	15/06/2012	2200
38	16/06/2012	1800
39	17/06/2012	1000
40	18/06/2012	800
41	19/06/2012	470
42	20/06/2012	230
43	21/06/2012	150
44	22/06/2012	100
45	23/06/2012	10

Tableau VII : variation de la densité optique de *Tetraselmis suecica* en fonction de temps dans le milieu F/2 Provasoli.

N° de jours	dates	absorbance
1	10/05/2012	0,027
2	11/05/2012	0,035
3	12/05/2012	0,055
4	13/05/2012	0,061
5	14/05/2012	0,085
6	15/05/2012	0,105
7	16/05/2012	0,144
8	17/05/2012	0,173
9	18/05/2012	0,241
10	19/05/2012	0,323
11	20/05/2012	0,345
12	21/05/2012	0,362
13	22/05/2012	0,366
14	23/05/2012	0,372
15	24/05/2012	0,402
16	25/05/2012	0,409
17	26/05/2012	0,412
18	27/05/2012	0,417
19	28/05/2012	0,428
20	29/05/2012	0,482
21	30/05/2012	0,435
22	31/05/2012	0,501
23	01/06/2012	0,492

24	02/06/2012	0,479
25	03/06/2012	0,476
26	04/06/2012	0,531
27	05/06/2012	0,477
28	06/06/2012	0,501
29	07/06/2012	0,522
30	08/06/2012	0,484
31	09/06/2012	0,581
32	10/06/2012	0,572
33	11/06/2012	0,564
34	12/06/2012	0,592
35	13/06/2012	0,621
36	14/06/2012	0,681
37	15/06/2012	0,562
38	16/06/2012	0,386
39	17/06/2012	0,171
40	18/06/2012	0,103
41	19/06/2012	0,071
42	20/06/2012	0,035