

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 و تهيئة الساحل
École 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
D'INGENIEUR EN SCIENCES DE LA MER**

OPTION : AQUACULTURE

Sujet :

**Contribution à la culture des espèces de microalgues d'eau
douce à intérêt aquacole :**

(*Chlamydomonas sp, Scenedesmus sp*)

Réalisé par :

M^{elle} KHERARBA Maha

Soutenu le 19-09- 2013 devant le jury suivant :

M^{me} MESLEM N.	Maitre-assistant A (ENSSMAL)	Présidente
M^{me} KORD A.	Attachée de recherche (CNRDPA)	Promotrice
M^{elle} MOKRANE Z.	Attachée de recherche (CNRDPA)	Examinatrice
Mr BELHASNAT K.	Maitre de conférences B (ENSSMAL)	Examinateur

Promotion 2013

Dédicace

Au nom d'Allah le plus grand merci lui revient de m'avoir guidé vers le droit chemin, de m'avoir aidé tout au long de mes années d'étude.

Je dédie ce modeste travail à ma mère Melzi Aouicha, école de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années des études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger.

A mon père Zherareba Mahdi. Rien au monde ne pourrait compenser les efforts et les sacrifices que tu as consentis jour et nuit pour mon éducation, mon bien être et la poursuite de mes études dans de bonnes conditions.

Aucune dédicace, ne saurait exprimer, le profond amour que je vous le porte. J'espère être à la hauteur de votre attente. Quisse Dieu, vous procure santé, bonheur et longue vie.

A mon adorable frère Aymen, puisse ce petit mot t'exprime mon grand amour pour toi. Je te souhaite les meilleurs résultats pour ton BAC nchalah.

A mon cher frère Riadh qui a été toujours là pour moi dans les moments difficiles, les mots ne suffisent pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour toi.

A mon petit chouchou, mon petit frère Badis que j'aime énormément. Je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur et de réussite.

Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

A mes chers grands parents symbole de tendresse et d'amour. Ceux sont les moindres sentiments que je puisse vous témoigner.

A mes chères amies et sœurs Amira, Tmen et Meriem. Je vous remercie pour tous les moments inoubliables qu'on a passé ensemble, que ce travail soit l'expression de mon grand amour.

A mes oncles, tantes, cousins et cousines. Vous avez de près ou de loin contribué à ma formation. Affectueuse reconnaissance.

Remerciements

On dit souvent que le trajet est aussi important que la destination. Les cinq années de maîtrise m'ont permis de bien comprendre la signification de cette phrase toute simple. Ce parcours, en effet, ne s'est pas réalisé sans défis et sans soulever de nombreuses questions pour lesquelles les réponses nécessitent de longues heures de travail.

Tout d'abord, je remercie le Centre National de Recherche et Développement de la Pêche et de l'Aquaculture (CNRDPA) de Bou Ismail de la Wilaya de Tipaza de m'avoir permis de réaliser ce travail.

Je tiens à remercier chaleureusement ma promotrice M^{me} Kord Affaf, pour avoir assuré l'encadrement de ce travail. Son disponibilité, son expérience, son savoir scientifique ont été déterminants dans l'aboutissement de ce travail, qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je remercie très sincèrement les membres de jury (M^{me} Meslem Nabila, M^{lle} Mokrane Zakia et Mr Belhasnat khaled). Vous me faites le très grand honneur d'examiner cette thèse.

Je remercie du fond du cœur Soumia, Fahima, et Belkacem (membres de l'équipe du projet) pour leur très encourageante solidarité.

Je tiens à remercier vivement tous les membres de l'équipe de laboratoire des écosystèmes aquatiques pour leur aide scientifique.

Je tiens également à exprimer ma gratitude à tous les gens de la bibliothèque de l'ENSSMAL, particulièrement les bibliothécaires Lila, Youcef et Chérif.

Un grand merci à ma chère école l'ENSSMAL, dans laquelle j'ai passé des moments inoubliables.

Pour finir, merci à toutes les personnes que j'ai malencontreusement oublié de remercier.

Résumé :

Dans ces dernières années, les microalgues attirent beaucoup d'attention à travers le monde en raison de leur forte valeur nutritive. Dans ce contexte il a été effectué un travail sur la mise en culture de deux espèces de microalgues d'eau douce (*Chlamydomonas* sp et *Scenedesmus* sp) isolées de lac El Goléa wilaya de Ghardaïa.

Une culture en batch de *Chlamydomonas* en milieu tris acétate phosphate et une culture de *Scenedesmus* en milieu bold basal initialement supplémenté de 10g/l de glucose ont été réalisées sous éclairage continu. Le suivi des deux cultures nous a permis de déterminer un taux de croissance spécifique ($\mu=0.29j^{-1}$) pour *Chlamydomonas* sp et ($\mu=0.31 j^{-1}$) pour *Scenedesmus* sp. Les analyses biochimiques de la biomasse lyophilisée de *Scenedesmus* révèlent une teneur élevée en substances bioactives dont les lipides constituent la majeure partie de 80%. Tandis que *Chlamydomonas* a engendré un rendement faible en ces molécules.

Mots clés : *Chlamydomonas* sp, *Scenedesmus* sp, culture.

Abstract :

In recent years, microalgae knew that attention to their nutritional value for smaller organizations. For this reason, a culture of two strains of freshwater microalgae (*Chlamydomonas* sp and *Scenedesmus* sp) isolated from Lake El Goléa wilaya Ghardaia.

A batch culture of *Chlamydomonas* in Tris acetate phosphate medium and a culture of *Scenedesmus* in bold basal medium initially supplemented with 10g / l of glucose were performed under continuous illumination. Monitoring of the two cultures has allowed us to determine a specific growth rate ($\mu = 0.29 j^{-1}$) for *Chlamydomonas* sp and ($\mu = 0.31 j^{-1}$) for *Scenedesmus* sp. Biochemical analyzes of the lyophilized biomass of *Scenedesmus* reveal a high content of bioactive substances including lipids constitute the majority 80%.While *Chlamydomonas* generated a low yield of these molecules.

Keywords: *Chlamydomonas* sp, *Scenedesmus* sp, culture.

TABLE DES MATIÈRES

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	01

1^{ère} partie : Synthèse bibliographique

I- Généralités sur les microalgues	02
I-1- Définition des microalgues	02
I-2- Classification des microalgues.....	02
I-2-1- Critères de classification.....	02
I-2-2- Différents groupes de microalgues	02
I-2-2-1- Les procaryotes.....	03
I-2-2-2- Les eucaryotes	03
I-3- Utilisation des microalgues.....	04
I-3-1- Utilisation en aquaculture.....	04
I-3-2- Autres utilisations	05
II- Les chlorophycées (microalgues vertes)	06
II-1- <i>Chlamydomonas</i> sp.....	06
II-1-1- Systématique	06
II-1-2- Description	06
II-1-3- Utilisations	08
II-2- <i>Scenedesmus</i> sp	09
II-2-1- Systématique	09
II-2-2- Description	09
II-2-3- Utilisations	10
III- Culture des microalgues.....	11
III-1- Historique.....	11
III-2- Conditions de culture	11
III-2-1- Conditions physiques	12
III-2-2- Conditions chimiques.....	13
III-3- Modes de nutrition des microalgues	14
III-3-1- Autotrophie	14
III-3-2- Hétérotrophie	14
III-3-3- Mixotrophie.....	14
III-4- Dynamique de croissance des microalgues	15
III-4-1- Phase de latence	15
III-4-2- Phase exponentielle.....	15
III-4-3- Phase stationnaire.....	16
III-4-4- Phase de déclin.....	16
III-5- Modes de culture des microalgues	17
III-5-1- Culture en batch	17
III-5-2- Culture continue.....	17
III-5-3- Culture semi continue ou « fed-batch »	18

2^{ème} partie : Matériels et méthodes

I- Matériels	19
II- Méthodes	19
II-1- Identification et entretien des microalgues.....	19
II-1-1- Identification des microalgues.....	19
II-1-2- Entretien des souches	20
II-2- Purification des souches	20
II-2-1- Choix du milieu de culture	20
II-2-2- Choix du mode de nutrition.....	21
II-2-3- Purification des souches de microalgues.....	21
II-2-3-1- Traitement par dilution.....	21
II-2-3-2- Traitement par les antibiotiques	22
II-3- Les étapes de la culture des microalgues.....	24
II-3-1- Mode de culture entrepris.....	24
II-3-2- Culture axénique.....	24
II-3-3- Choix des conditions d'incubations	25
II-4- Analyse biométrique de la culture	27
II-4-1- Densité optique.....	27
II-4-2- Comptage du nombre de cellules	27
II-4-3- Dosage des chlorophylles.....	28
II-5- Calcul du taux de croissance spécifique	29
II-6- La récolte	30
II-6-1- Centrifugation.....	30
II-6-1- Filtration	30
II-7- Lyophilisation.....	31
II-8- Analyse biochimique	32
II-8-1- Dosage des lipides	33
II-8-2- Dosage des protéines.....	34
II-8-3- Dosage des sucres totaux	35

3^{ème} partie : Résultats et discussions

I- Identification des souches	38
I-1- Espèce <i>Chlamydomonas sp</i>	38
I-2- Espèce <i>Scenedesmus sp</i>	38
II- Culture des microalgues	39
II-1- Choix du milieu de culture	39
II-2- Résultats des étapes de purification entreprises pour la mise en route d'une culture axénique.....	41
II-2-1- Résultats du traitement par dilution.....	41
II-2-2- Résultats du traitement par les antibiotiques	42
III- Résultats du suivi des cultures	43
III-1- Cinétique de croissance de <i>Chlamydomonas sp</i> cultivée en milieu TAP	43
III-2- Cinétique de croissance de <i>Scenedesmus sp</i> cultivée en milieu 6NBBM+G.	45
IV- Détermination de taux de croissance spécifique	47
V- Analyse biochimique.....	48
V-1- Dosage des lipides.....	48
V-2- Dosage des protéines.....	48

V-3- Dosage des sucres totaux.....	48
Conclusion	51
Références bibliographiques.....	52
Annexes	

LISTE DES FIGURES

Figure 01 : <i>Chlamydomonas</i> sp	06
Figure 02 : Schéma d'une cellule de chlamydomonas	07
Figure 03 : Cycle de reproduction de <i>Chlamydomonas moewusii</i>	08
Figure 04 : <i>Scenedesmus</i> sp	09
Figure 05 : Schéma d'une cellule de Scenedesmus	09
Figure 06 : Courbe de croissance des microalgues	17
Figure 07 : Photographie de la souche <i>Chlamydomonas</i> sp	19
Figure 08 : Photographie de la souche <i>Scenedesmus</i> sp	19
Figure 09 : Photographies du traitement par dilution	21
Figure 10 : Photographies du traitement par les antibiotiques	23
Figure 11 : La culture de l'espèce <i>Chlamydomonas</i> sp	25
Figure 12 : Schéma résumant les étapes pour la mise en route de la culture	26
Figure 13 : Comptage sous microscope optique en utilisant une lame Malassez	27
Figure 14 : Récolte de la biomasse par centrifugation	30
Figure 15 : Récolte de la biomasse microalgales par filtration	31
Figure 16 : Lyophilisation de la biomasse microalgales	32
Figure 17 : Extraction des lipides	34
Figure 18 : Dosage des protéines	35
Figure 19 : Traçage de la courbe d'étalonnage des glucides	36
Figure 20 : Dosage des glucides en poudre des microalgues	37
Figure 21 : Photographies de l'espèce <i>Chlamydomonas</i> sp observées au microscope optique GX 1000	38
Figure 22 : Photographies de l'espèce <i>Scenedesmus</i> sp observées au microscope optique GX 400, GX 1000	39
Figure 23 : Photographies de l'espèce <i>Scenedesmus</i> sp cultivée en BBM, BBM+G et 6NBBM	40

Figure 24 : Photographie de <i>Chlamydomonas</i> sp dans le milieu de culture TAP	40
Figure 25 : Dénombrement des colonies bactériennes après traitement par dilution pour l'espèce <i>Scenedesmus</i> sp	41
Figure 26 : Dénombrement de colonies bactériennes après traitement par antibiotiques pour l'espèce <i>Chlamydomonas</i> sp	42
Figure 27 : Dénombrement des colonies bactériennes après traitement par antibiotiques pour l'espèce <i>Scenedesmus</i> sp	43
Figure 28 : Cinétique de croissance de <i>Chlamydomonas</i> sp cultivée en milieu TAP	43
Figure 29 : Nombre de cellules de <i>Chlamydomonas</i> sp cultivée en milieu TAP	44
Figure 30 : Variation de la concentration en pigments photosynthétique de <i>Chlamydomonas</i> sp dans la culture en milieu TAP	44
Figure 31 : Cinétique de croissance de <i>Scenedesmus</i> sp cultivée en milieu 6NBBM+G .	45
Figure 32 : Nombre de cellules de <i>Scenedesmus</i> sp cultivée en milieu 6NBBM+G	46
Figure 33 : Variation de la concentration en pigments photosynthétique de <i>Scenedesmus</i> sp dans la culture en milieu 6NBBM+G	46
Figure 34 : Courbe d'étalonnage des glucides	49

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Dénombrement des colonies bactériennes après traitement par dilution	41
Tableau II : Dénombrement des colonies bactériennes après traitement par antibiotiques	42
Tableau III : Résultat de calcul du taux de croissance spécifique des deux cultures.....	47
Tableau IV : Rendement des espèces en lipides	48
Tableau V : Résultats de l'absorbance à 685nm	48
Tableau VI : Rendement des espèces de microalgues en protéines	48
Tableau VII : Absorbances de la solution de glucose	49
Tableau VIII : Rendement des espèces de microalgues en glucides	49
Tableau IX : Résultats de la composition biochimique de <i>Chlamydomonas</i> sp	49
Tableau X : Résultats de la composition biochimique de <i>Scenedesmus</i> sp	50
Tableau XI : Données récapitulatives en substances bioactives de <i>Chlamydomonas</i> sp et <i>Scenedesmus</i> sp	50

Introduction

En raison de la diversité des écosystèmes en l'Algérie, une importance flore aquatique se répartit sur les différentes zones humides du pays. Cette richesse floristique est constituée de différentes espèces végétales, parmi lesquelles : les microalgues.

Une telle diversité, non exploitée, constitue un réel potentiel pour la recherche et l'industrie. Les microalgues 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 le premier maillon de la production primaire **(Audineau, 1985)**.

Ces dernières années, la culture de microalgues, 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 la culture de deux espèces de microalgues autochtone d'eau douce (*Chlamydomonas* sp et *Scenedesmus* sp), isolées à partir du lac El- Goléa de Ghardaïa. Ce travail rentre dans le cadre des activités du Centre National de Recherche et de Développement de la Pêche et de l'Aquaculture (CNRDPA) qui porte sur « la sélection et l'optimisation des conditions de culture des microalgues d'eau douce à intérêt aquacole ».

Ce manuscrit est composé de trois principales parties, la première comporte une synthèse bibliographique divisée en trois chapitres : le premier renferme des généralités sur les microalgues. Le deuxième chapitre décrit les espèces étudiées de la famille des chlorophycées. Le troisième chapitre est consacré à la culture des microalgues dont les différents modes de culture et les principaux facteurs influençant la croissance de la biomasse. La deuxième partie, matériels et méthodes décrit en détail les méthodes adoptées pour effectuer ce travail y compris l'identification et la purification des deux espèces, procédure de la mise en route de la culture et enfin les analyses biométriques et biochimiques ayant lieu pour quantifier et caractériser la biomasse microalgale.

Les résultats obtenus ainsi que les discussions fournies sont assemblés dans la troisième partie du document.

Cette étude s'achève par une conclusion.

1ERE PARTIE :
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I- Généralités sur les microalgues

I-1- Définition des microalgues :

Microphytes ou microalgues sont des algues microscopiques, on les trouve généralement dans les systèmes d'eau douce et marine. Ce sont des micro-organismes unicellulaires ou pluricellulaires indifférenciés, procaryotes ou eucaryotes. Les microalgues sont des êtres photosynthétiques c'est-à-dire qu'elles sont capables de produire de la matière organique à partir d'éléments minéraux grâce aux processus d'assimilation photosynthétique. Elles sont importantes pour la vie sur terre, elles produisent environ la moitié de l'oxygène atmosphérique (**Thurman, 1997**).

I-2- Classification des microalgues :

La biodiversité des microalgues est énorme, elles représentent une ressource presque inexploitée. Il a été estimé qu'il existe environ 200000-800000 espèces dont environ 50000 espèces sont décrites et plus de 15000 nouveaux composés issus de la biomasse algale ont été déterminés chimiquement (**Starcks, 2012**).

Actuellement, les microalgues s'adaptent à des milieux très différents ce qui explique la variété d'espèces (**Thurman, 1997**).

I-2-1- Critères de classification :

Les microalgues peuvent être classées selon : leurs propriétés morphologiques (**Fogg, 1953**), la nature de leur cycle de vie, la nature chimique des produits photosynthétiques de réserve (produit d'accumulation intracellulaire), l'organisation de leurs membranes photosynthétiques (**Carlsson et al., 2007**) ou leurs pigmentations.

I-2-2- Différents groupes de microalgues :

On distingue principalement deux grands groupes de microalgues :

I-2-2-1- Les procaryotes :

- **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. Les pigments présents dans la cellule sont nombreux : chlorophylle a et c, phycocyanine bleu-vert, phycoérythrine rouge et pigments d'accompagnement, β carotène et xanthophylles jaunes ou ochracés. Certaines espèces ne possèdent que la chlorophylle. Ces pigments sont diffusés dans le cytoplasme et donnent aux cellules une coloration homogène.

Les réserves cellulaires sont constituées par un corps très voisin de glycogène dispersé en particules très petites (**Bourrelly, 1966**).

Les cyanophytes ne possèdent pas de formes flagellées. C'est un groupe d'algues très abondant dans les eaux douces (**Iltis, 1980**).

I-2-2-2- Les eucaryotes :

- **Chlorophytes :**

Les algues vertes sont des organismes eucaryotes à noyau bien individualisé ; elles possèdent des plastes d'un vert franc contenant de la chlorophylle a et b associé à de l' α et β carotène et des xanthophylles identiques à celles des plantes supérieures. Les réserves cellulaires sont constituées d'amidon intraplastidial. Les formes nageuses possèdent en général deux ou quatre flagelles de même taille.

Les chlorophytes qui regroupent environ six cents genres et plus de huit mille espèces dont les quatre cinquièmes environ vivent en eau douce (**Iltis, 1980**).

D'autres genres appartenant à la famille des eucaryotes sont cités comme suit : (**Bourrelly, 1966 ; Iltis, 1980 ; Hoff et al., 2001**).

- **Rhodophytes**
- **Euglenophytes**
- **Cryptophytes**
- **Pyrrhophytes**

- **Chrysophytes ou chromophytes :**

Ce genre renferme les classes unicellulaires suivantes : (**Bourelly, 1966 ; Hoff et al., 2001**)

- Chrysophycées
- Bacillariophycées ou diatomées
- Chloromonadophycées
- Xanthophycées

I-3-Utilisation des microalgues :

Les microalgues sont une source d'oligo-éléments et de vitamines pour la communauté aquatique. Elles sont riches en macronutriments, protéines, glucides et acides gras essentiels (**Hoff et al., 2001**). Au vu de leur biodiversité et leurs propriétés biochimiques, les microalgues se révèlent très prometteuses pour de nombreuses applications dans des domaines variés tels que l'aquaculture, l'industrie pharmaceutique, agro-alimentaire, l'environnement et les énergies renouvelables.

I-3-1- Utilisation en aquaculture :

Les microalgues étant une source essentielle de nourriture pour l'élevage de toutes les étapes de mollusques bivalves marins (palourdes, huîtres, pétoncles), les stades larvaires de certains gastéropodes marins (ormeau, coquille de conque), les larves de plusieurs espèces de poissons marins, pénéidés et zooplancton (**Lavens et al., 1996**).

Les microalgues constituent la nourriture obligatoire du zooplancton filtreur qui sert de proie à des larves des espèces élevées en éclosion (**Barnabé, 1989**).

Les microalgues fournissent des pigments essentiels tels que l'astaxanthine, la zéaxanthine, la chlorophylle et la phycoyanine qui améliorent la coloration et la santé des poissons et d'invertébrés (**Hoff et al., 2001**).

Les microalgues ont un effet thérapeutique comme antibiotiques sur les poissons et les autres animaux (**Hoff et al., 2001**).

Le β carotène est un colorant extrait de la microalgue *porphyridium cruentum* qui sert à colorer la chair des truites (**Morice et Jamma, 1992**).

I-3-2- Autres utilisations :

∞ Dans le domaine pharmaceutique, les polysaccharides extraites des microalgues trouvent des applications industrielles et commerciales dans le domaine médical (activité, antioxydante, antivirale, anti-tumorale et anticoagulante) (**Mayer et Lehmann, 2001**). La fucoxanthine est un caroténoïde utilisé à des fins médicales (**Moreau et al., 2006**). La phycocyanine extraite de la *Spiruline* sp, est un pigment bleu utilisé dans les industries cosmétiques sous le nom « Linablue » (**Morice et Jamma, 1992**).

∞ Dans le domaine énergétique, les microalgues peuvent aujourd'hui être directement impliquées dans la production d'énergie nouvelle et renouvelable notamment la production d'hydrocarbures et de biocombustibles comme l'hydrogène. En effet, pendant la photosynthèse, certaines espèces peuvent produire de l'hydrogène sous l'action des hydrogénases. Des travaux récents ont montré qu'une culture de 850 ml de microalgue peut produire jusqu'à 3 ml d'hydrogène par heure (**Chader, 2003**).

∞ Dans l'industrie alimentaire, l'utilisation des microalgues comme source de nourriture vient des pratiques de populations sujettes à la famine. Les chinois utilisaient la microalgue *Nostoc* commune pour assurer l'alimentation il y a plus de 2000 ans (**Danxiang et al., 2004**). Actuellement, la plus connue dans ce domaine est une microalgue appelée *Arthrospira platensis* ou Spiruline, que l'on trouve comme complément à l'alimentation dans de nombreux pays comme le Japon, l'Inde ou le Mexique (**Fox, 1999**).

Ainsi le β -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 utilisés en alimentation humaine, animale et en aquaculture (**Gouveia et al., 2007**).

∞ En agriculture, les microalgues apparaissent également comme de bons fertilisants des sols pauvres puisqu'elles apportent notamment du potassium, de l'azote, éléments essentiels à la croissance végétale. Elles permettent aussi de capturer et de garder l'humidité. Enfin, elles accélèrent la pousse des cultures et les protègent en limitant la prolifération des épiphytes (**Chader, 2003**).

II- Les chlorophycées (microalgues vertes)

Les chlorophycées sont très abondantes en eaux douces. Elles peuvent se développer en mode unicellulaire ou en colonies qui peuvent devenir très denses. Elles accumulent l'énergie qu'elles capturent, principalement par photosynthèse, sous la forme d'hydrates de carbone et d'huiles. Elles peuvent tolérer plusieurs types de conditions. Elles se sont d'ailleurs adaptées à des milieux étonnément variés (**Doré-Deschênes, 2009**).

Notre étude a été portée sur deux espèces de chlorophycées d'eau douce à savoir : *Chlamydomonas* sp et *Scenedesmus* sp.

II-1- *Chlamydomonas* sp

II-1-1-Systématique :

Phylum : Chlorophyte

Classe : Chlorophycée

Ordre : Volvocales

Famille : Chlamydomonadacée

Genre : Chlamydomonas

Espèce : *Chlamydomonas* sp

(**Bourrelly, 1966**)

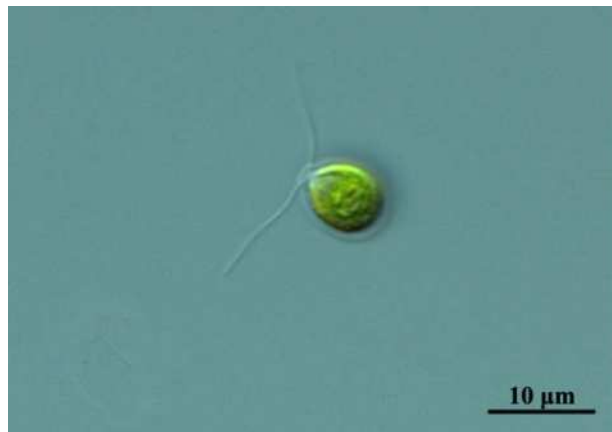


Figure 01: *Chlamydomonas* sp (Guillard, 1957).

II-1-2- Description :

C'est une microalgue verte, mobile, de cellule solitaire, libre, de forme régulière ou dorsiventralité plus ou moins marquée, ovoïde, ellipsoïde, globuleuse et fusiforme, portant 2 fouets égaux. La section transversale est toujours ronde, rarement un peu elliptique ; les fouets naissent l'un près de l'autre, la membrane est bien marquée et porte parfois une papille entre les fouets ; elle est presque toujours lisse. Le chromatophore est de forme très variée.

Le stigma peut être présent ou absent ; il y'a une, deux ou plusieurs vacuoles contractiles. Les pyrénoides, lorsqu'ils sont présents, varient de un à plusieurs (Figure 02) (**Bourrelly, 1966 ; Ittis, 1980**).

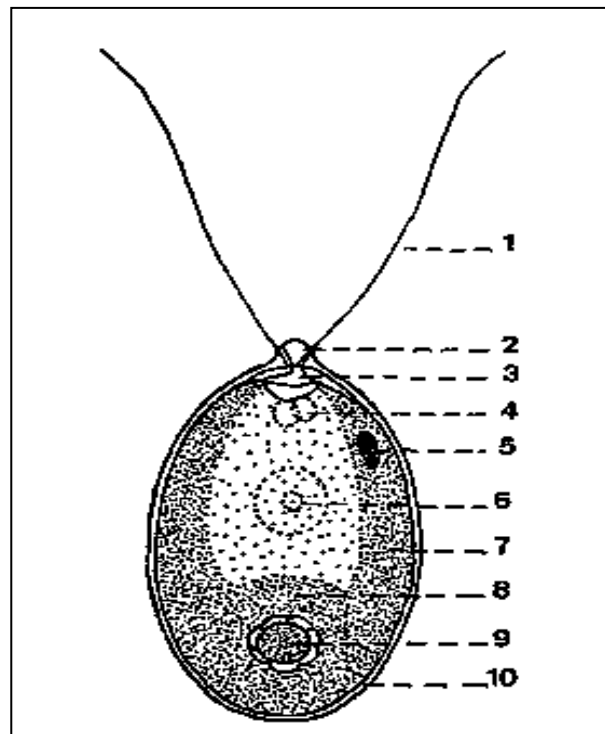


Figure 02: Schéma d'une cellule de *Chlamydomonas* sp (Bourrelly, 1966).

1, flagelle; 2, papille membranaire ; 3, papille cytoplasmique ; 4, vacuoles contractiles; 5, stigma; 6, noyau et nucléole; 7, chloroplaste en coupe optique longitudinale; 8, partie basale du plaste ; 9, pyrénoïde entouré d'amidon ; 10, membrane.

Ce genre, le plus important des volvocales, regroupe près de 500 espèces (Bourrelly, 1966 ; Ittis, 1980).

La reproduction est soit végétative, soit sexuée (Figure 03). Les stades palmelloïdes et gloécystoïdes sont fréquents (Bourrelly, 1966).

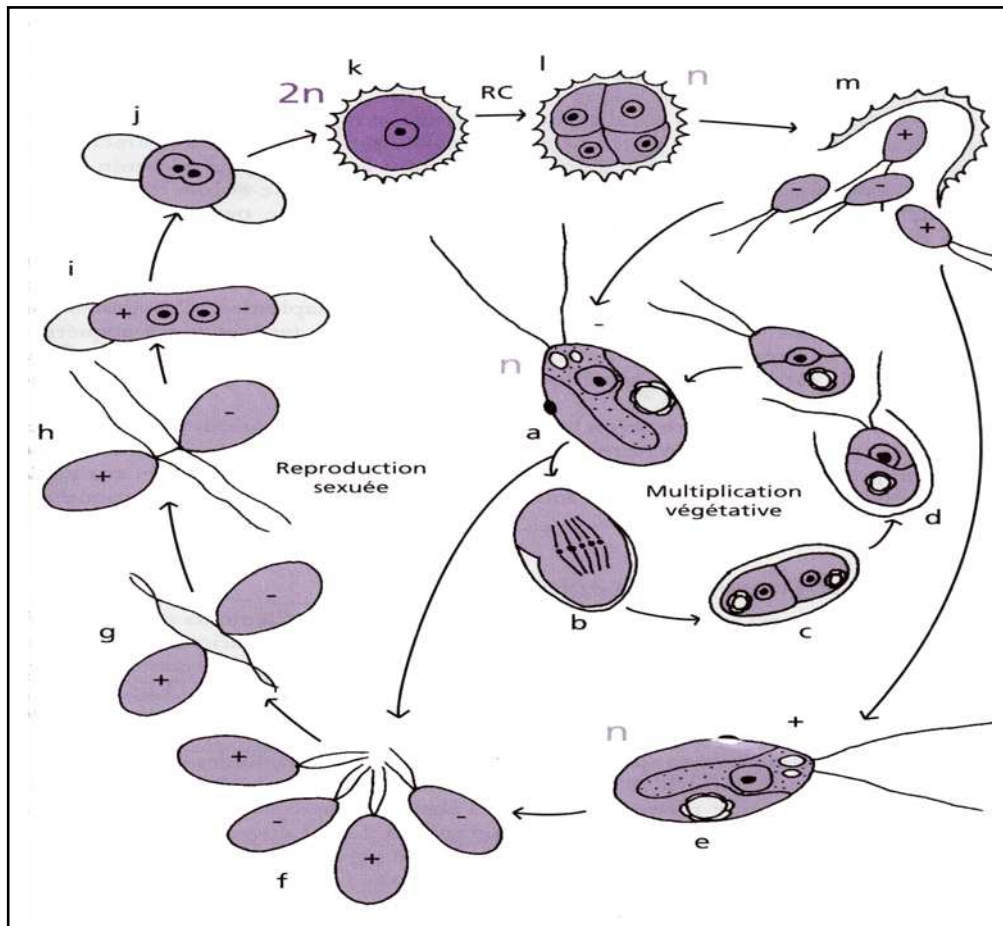


Figure 03: Cycle de reproduction de *Chlamydomonas moewusii* (Reviere, 2002).

a. Cellule végétative haploïde « - » pouvant fonctionner comme un gamète. b. Mitose. c. Formation de deux cellules filles. d. Libération des cellules filles. e. Cellule végétative haploïde « + » pouvant fonctionner comme un gamète. f. Groupe de gamètes réunis par leurs flagelles. g. Union d'un gamète « - » avec un gamète « + ». h. Gamètes unis par un tube de copulation. i. Plasmogamie. j. Caryogamie. k. Zygote diploïde entouré d'une paroi résistante. l. méiose et formation de spores. m. libération des spores. n = haploïde. 2n = diploïde. RC = réduction chromatique (méiose). (Modifié d'après Bold et Wynne, 1978).

II-1-3- Utilisation :

- ❖ Utiliser comme une source de nourriture pour les rotifères (Hoff et al., 2001).
- ❖ L'espèce *Chlamydomonas reinhardtii* reste l'organisme le plus utilisé dans la recherche appliquée sur le bio-hydrogène (Melis et Happe, 2001).
- ❖ *Chlamydomonas reinhardtii* cultivée dans des conditions de stress permet d'accumuler les lipides dans la cellule sous forme de triglycérides utilisés pour la production de biocarburant (Siaut et al., 2011).

II-2- *Scenedesmus* sp

II-2-1-Systématique :

Phylum : Chlorophyte

Classe : Chlorophycées

Ordre : Chlorococcales

Famille : Scenedesmaceés

Genre : *Scenedesmus*

Espèce : *Scenedesmus* sp

(Bourrelly, 1966)

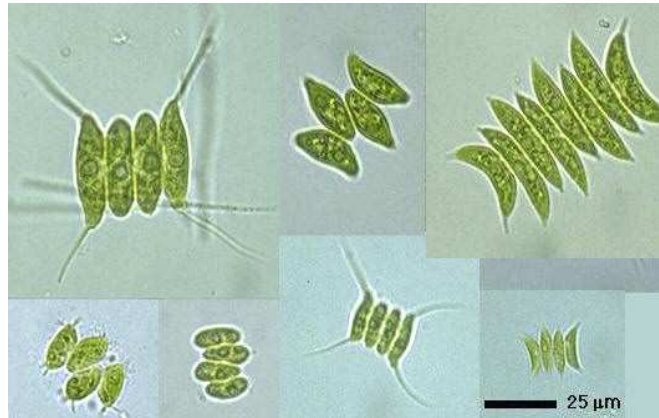


Figure 04 : *Scenedesmus* sp (Kojima et al., 1995).

II-2-2- Description :

Il s'agit d'une microalgue 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, de pores. Les cellules marginales du cénobe ayant souvent une ornementation différente de celles du centre. Chaque cellule présente un plaste portant d'ordinaire un pyrénioïde bien visible (Figure 05) (Bourrelly, 1966).

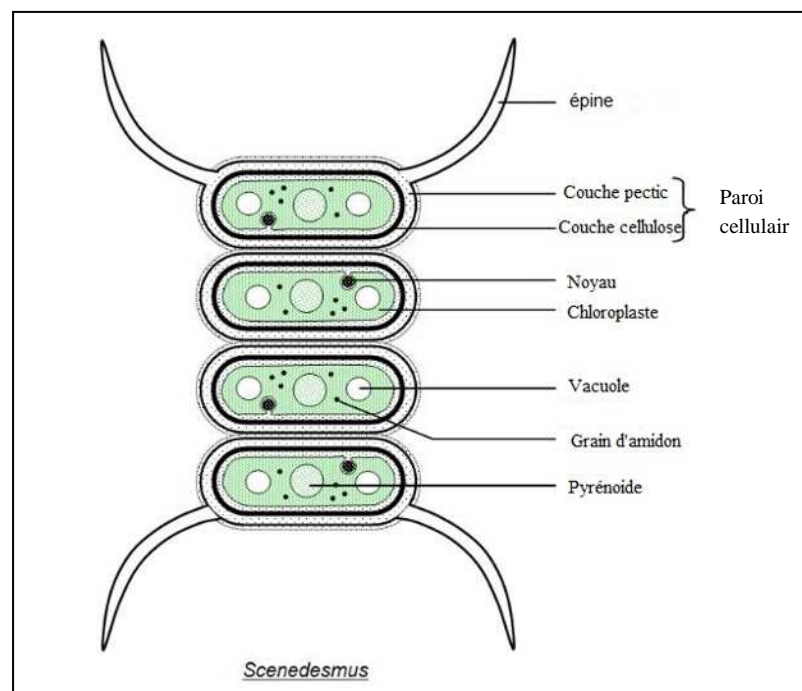


Figure 05 : Schéma d'une cellule de *Scenedesmus* sp (Cronodon, 2007).

Le genre *Scenedesmus* comporte un nombre important d'espèces (plus de 150 dans l'ensemble des eaux douces) qui sont réparties en 4 sections suivant la morphologie des cellules et leur ornementation (**Bourrelly, 1966 ; Iltis, 1980**).

La multiplication se fait par auto-sporulation : chaque cellule redonne ainsi un cénobe complet (**Bourrelly, 1966**).

II-2-3- Utilisations :

- ❖ Les espèces de *Scenedesmus* ont été étudiées pour leurs efficacité possible comme bio-ressources pour des applications comme l'alimentation des poissons, de la nourriture humaine et produits pharmaceutiques (**Kim et al., 2007**).
- ❖ *Scenedesmus* a été utilisée comme agent bioremediature dans l'élimination des substances nutritives inorganiques de l'eau polluée (**kim et al., 2007**).
- ❖ *Scenedesmus* contient tous les acides aminés essentiels et une quantité importante de protéines, de lipides et minéraux (**Toyub et al., 2008**).

III-Culture des microalgues

III-1- Historique :

La culture de microalgues est l'une des biotechnologies modernes. Les premières cultures unialgales ont été atteintes par Beijerinck en 1890 avec *Chlorella vulgaris*, et 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 microalgues a vraiment commencé à être l'objet de recherches depuis 1948 à Stanford (USA), Essen (Allemagne) et Tokyo et le livre classique édité par Burlew (1953) résume beaucoup de ces premières études.

La culture à grande échelle de microalgues a débuté au début des années 1960 au Japon avec la culture de *Chlorella* suivie dans le début des années 1970 avec la création d'une récolte spiruline et la facilité de mise en culture dans le lac Texcoco (Mexique) par Sosa Texcoco SA en 1977. En 1980 il y avait 46 usines à grande échelle en Asie produisant plus de 1000 kg de microalgues (*Chlorella* principalement) par mois (Kawaguchi, 1980).

La production commerciale de *Dunaliella salina*, comme une source de bêta-carotène, est devenu le troisième secteur important de microalgues, lorsque les installations de production ont été établies par Western Biotechnology SA et Betatene Ltd (maintenant Cognis Nutrition & Santé) en Australie en 1986 (Borowitzka, 2011).

Ainsi que ces algues, la production à grande échelle de cyanobactéries (algues bleu-vert) a débuté en Inde à la même époque. Plus récemment, plusieurs usines produisant des *Haematococcus pluvialis* comme une source d'astaxanthine ont été établis aux Etats-Unis et en Inde. Ainsi, dans une courte période d'environ 30 ans, l'industrie de la biotechnologie des microalgues s'est développée et diversifiée considérablement (Borowitzka, 2011).

III-2- Conditions de culture :

La croissance des microalgues en milieu de culture dépend des conditions physiques et chimiques (Barnabé, 1989 ; Lavens et al., 1996 ; Hoff et al., 2001) :

III-2- 1-Conditions physiques :

- **Température :**

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

Les basses températures ne tueront pas les microalgues, mais vont ralentir considérablement la croissance, alors que des températures supérieures à 35°C tuent la majorité des microalgues (**Hoff et al., 2001**).

- **Salinité :**

Certaines microalgues poussent plus facilement à des salinités inférieures à celles de leur habitat naturel, qui est obtenu par dilutions de l'eau de mer avec l'eau douce pour atteindre une salinité de 20 à 24‰ pour les espèces marines (**Lavens et al., 1996 ; Barnabé, 1989**).

- **Lumière :**

La lumière est 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 de la culture et de la densité de la culture d'algues : lorsque les concentrations cellulaires sont importantes à des profondeurs supérieures, l'intensité lumineuse doit être augmentée pour pénétrer à travers la culture (par exemple 1000 lux est adapté pour Erlenmeyer, 5000-10000 est nécessaire pour les plus grands volumes).

La lumière peut être naturelle ou fournie par des tubes fluorescents. Intensité lumineuse trop élevée (par exemple la lumière directe du soleil, ou un petit récipient près de la lumière artificielle) peut entraîner la photo-inhibition (**Lavens et al., 1996**).

La durée d'éclairage artificiel est entre 12 à 18 h/jour (**Barnabé, 1989**), mais le phytoplancton cultivé se développe normalement sous un éclairage constant (**Lavens et al., 1996**).

- **Turbulence ou l'agitation :**

La plupart des cultures de microalgues ont tendance à sédimenter. Il est donc nécessaire de les agiter quotidiennement, manuellement en ce qui concerne les petits volumes jusqu'à 1 ou 2 litres, tandis que pour les volumes plus importants, on utilise l'agitation par bullage d'air, qui a l'avantage de porter du gaz carbonique (**Barnabé, 1989**) et assure une bonne répartition de la température (**Lavens et al., 1996**).

III-2-2- Conditions chimiques :

- **Éléments nutritifs :**

Une bonne croissance d'une culture de microalgues dépend d'un équilibre entre les éléments nutritifs majeurs et mineurs spécifiques. Un déséquilibre dans ces nutriments entraîne rapidement l'arrêt de la croissance de la culture.

Alors les milieux de culture doivent être enrichis en macronutriments (tels que nitrate, phosphore et silice qui est nécessaire uniquement pour les diatomées), et en micronutriments (tels que les métaux traces et les vitamines qui sont nécessaires pour une croissance optimale). En plus les microalgues sont auxotrophique, de sorte qu'ils sont incapables de synthétiser toutes les vitamines nécessaires et doivent les assimiler de leur environnement. (**Hoff et al., 2001**). Alors la Thiamine (vitamine B1), cobalamine (B12) et la biotine sont considérées comme des vitamines essentielles pour de nombreuses microalgues (**Spotte, 1979**).

- **pH :**

L'intervalle de pH pour les espèces de microalgues les plus cultivés 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 maintenir un 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 croissance d'algues (**Lavens et al., 1996**).

- **Gaz carbonique (aération) :**

Les microalgues utilisent du dioxyde de carbone lors de la photosynthèse et libèrent de l'oxygène.

L'air contient la source de carbone pour la photosynthèse, sous la forme de dioxyde de carbone. Pour des cultures très denses, le CO₂ provenant de l'air (contenant 0,03% de CO₂) par barbotage, dans la culture limite la croissance des microalgues et le dioxyde de carbone pure peut être complété à l'alimentation d'air (par exemple, à un taux de 1% du volume de l'air). En outre, le CO₂ permet le maintien de pH en raison de l'équilibre CO₂/HCO³⁻ (Lavens et al., 1996).

III-3- Modes de nutrition des microalgues :

III-3-1- Autotrophie :

C'est le mode de nutrition par lequel les algues élaborent, grâce à la photosynthèse, leur propre substance à partir des éléments minéraux dissous dans l'eau et du CO₂ (Dabbadie, 1992).

L'autotrophie permet aux microalgues d'utiliser les rayons solaires afin de synthétiser leur énergie. Les microalgues de 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). Ce carbone organique est essentiel à la synthèse de toutes les composantes organiques nécessaires à leur survie (Cantin, 2010).

III-3-2-Hétérotrophie :

Plusieurs microalgues ont un métabolisme hétérotrophe de nutrition et celles-ci n'ont pas besoin de l'énergie solaire. Elles utilisent plutôt une source de carbone organique pour la production de l'énergie et des composants organiques.

C'est le mode de nutrition qui permet l'assimilation directe des substances organiques, de façon plus ou moins indépendante de la photosynthèse (Dabbadie, 1992).

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).

III- 3-3-Mixotrophie :

Le terme "mixotrophie" est synonyme de photo-hétérotrophie pour Zajic et Chiu (1970) alors que pour Neilson et Lewin (1974), c'est un besoin de carbone organique

pour croître à la lumière, vraisemblablement en raison d'une incapacité d'assimiler le CO₂ à la lumière. **Amblard (1991)** considère qu'il y a mixotrophie lorsque les nutriments autotrophe et hétérotrophe fonctionnent simultanément.

D'après **Neilson et Lewin (1974)**, l'acétate peut être assimilé par de nombreuses algues par exemple : *Chlamydomonas*, tant à la lumière qu'à l'obscurité.

Certaines espèces de *Scenedesmus* vis-à-vis du glucose. Elles sont hétérotrophes. 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**).

III-4- Dynamique de croissance des microalgues :

Les microalgues se développent jusqu'à la mort des cellules. La croissance des microalgues suit une courbe bien définie caractérisée par 4 phases qui sont le reflet des changements dans la biomasse et dans son environnement (Figure 06) (**Yuan-Kun Lee and Hui Shen, 2004**).

III-4-1-Phase de Latence :

Elle correspond à la phase d'adaptation des cellules aux nouvelles conditions de culture.

Elle est relativement longue lorsque les cultures sont transférées d'un milieu solide à une culture liquide (Figure 06) (**Hoff et al., 2001**).

Le retard de croissance pourrait être la période d'adaptation physiologique en raison de changements dans les conditions de nutriments ou le milieu de culture, mais les cultures inoculées avec des cellules en phase de croissance ont une phase d'adaptation courte (**Yuan-Kun Lee et Hui Shen, 2004**).

III-4-2-Phase exponentielle :

Une fois la phase de latence est terminée, les cellules se sont adaptés à ce nouvel environnement et commencent à croître et à se multiplier (phase d'accélération de la croissance), et finalement entrent dans la phase de croissance exponentielle (ou logarithmique) (Figure 06). Au cours de cette phase, les cellules croissent et se divisent en tant que fonction exponentielle de temps, tant que supports minéraux et de l'énergie lumineuse sont saturés (**Yuan-kun Lee et Hui Shen, 2004**).

La durée de croissance exponentielle varie en fonction des éléments nutritifs, la lumière, le dioxyde de carbone, le récipient de culture, ou d'autres facteurs physiques et chimiques qui limitent la croissance. Vers la fin de la division des cellules, la croissance en phase exponentielle ralentit considérablement. Les cellules récoltées au cours de la limite supérieure de cette phase sont nutritionnellement équilibré (**Hoff et al., 2001**).

Au cours de cette phase, la densité de cellules augmente en fonction du temps t selon une fonction logarithmique :

$$C_t = C_0 \cdot e^{mt}$$

- C_t et C_0 : la concentration des cellules à t et t_0 respectivement.
- m : taux de croissance spécifique, dépend principalement des espèces d'algues, de l'intensité lumineuse et la température (**Lavens et al., 1996**).

III-4-3-Phase stationnaire :

Cette phase se produit lorsque la densité de cellules demeure relativement constante pendant une longue période de temps (Figure 06), avec des périodes de diminution, suivies de périodes d'augmentation en alternance.

Dans les cultures de lots, les nutriments sont consommés sans remplacement et la phase stationnaire peut être très courte si les densités cellulaires sont exceptionnellement élevées. Alors que, dans les cultures continues cela peut être prolongé par de faibles niveaux de reconstitution des éléments nutritifs. Cellules récoltées à partir de cette phase ne sont pas aussi nutritifs que ceux pris au cours de la croissance exponentielle (**Hoff et al., 2001**).

III-4-4-Phase de déclin :

Durant cette phase, la qualité de l'eau se détériore et les cellules ont faim, la densité cellulaire commence à diminuer rapidement, et une situation appelée "crash" se développe.

Des Accidents peuvent se produire pour plusieurs raisons, notamment :

- L'épuisement des éléments nutritifs,
- la carence en O_2 ,
- Une perturbation de pH.

Ces accidents de la culture peuvent se produire du jour au lendemain, il est donc important de surveiller de près les cultures pour des alertes précoces d'un accident comme la baisse des densités cellulaires ou des changements de couleur de culture.

Une fois que la culture change de couleur, la récupération est pratiquement impossible. Les cellules microalgales du déclin ont également peu de valeur nutritive pour le zooplancton (Hoff et al., 2001).

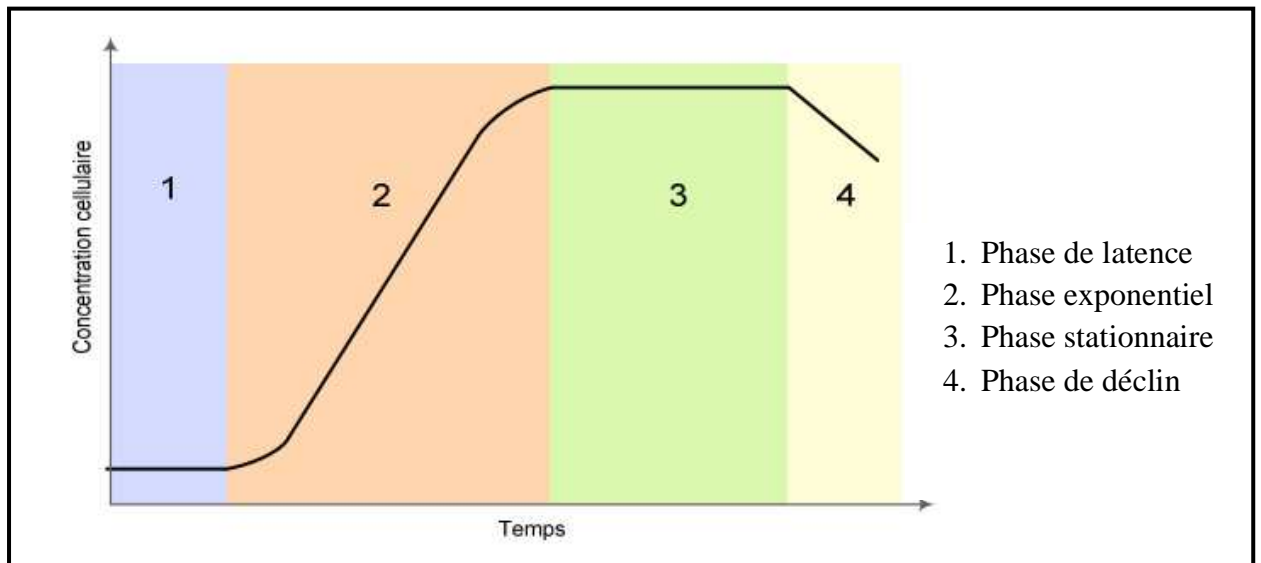


Figure 06: Courbe de croissance des microalgues (Fogg, 1987).

III-5-Modes de cultures des microalgues :

Il existe trois principaux modes de culture de microalgues :

III- 5-1- Culture en batch :

La culture en batch est la manière la plus simple de produire du phytoplancton : Un inoculum contenant des cellules de phytoplancton à cultiver est injecté dans un récipient exposé à la lumière (ballon, bouteille, bac, etc.) contenant tous les éléments nutritifs nécessaires à leur multiplication et donc à la croissance de la population phytoplanctonique. Après cette introduction initiale, il n'y a plus d'échanges d'éléments nutritifs, ni de biomasse avec l'extérieur : le milieu est clos.

C'est pourquoi, toujours par analogie au fait que la culture continue est un système ouvert, on peut également appeler une culture en batch une culture fermée (Herbland, 2007).

III-5-2- Culture continue :

La culture en continu, c'est une culture dans laquelle un milieu de culture est introduit en continu dans une chambre de croissance et la culture en excès est éliminée par lavage

simultanément. Ce mode de culture permet le maintien des cultures très proche de la vitesse de croissance maximale.

Deux catégories de cultures continues peuvent être distinguées :

* La culture de turbidostat, dans lequel la concentration d'algues est maintenue à un niveau prédéfini par dilution de la culture avec du milieu frais au moyen d'un système automatique.

* Culture chemostat, dans lequel un flux de milieu frais est introduit dans la culture à un débit prédéterminé constant. Celui-ci ajoute un nutriment essentiel de limitation (par exemple le nitrate) à un taux fixe et de cette façon le taux de croissance et non la densité de cellules est maintenue constante (**Fogg, 1987 ; Lavens et al., 1996**).

III-5-3- Culture semi continue ou « fed-batch »:

La culture semi-continue est un système dans lequel une partie de la culture est récolté, et la quantité consommée est remplacée par du milieu de culture frais et sels nutritifs. Après avoir laissé 2-3 jours, le reste des cellules croissent et se divisent, les cultures peuvent être exploitées pour un maximum de 7 à 8 semaines (**Laing, 1991**). La culture semi-continue donne plus d'algues que la culture en batch pour une taille de réservoir donné. Mais les prédateurs et/ou les contaminants et les métabolites s'accumulent, rendant la culture inutilisable. (**Lavens et al., 1996**).

2EME PARTIE :
MATERIELS ET METHODES



Le présent travail a été réalisé au niveau du laboratoire des écosystèmes aquatiques du Centre National de Recherche et Développement de la Pêche et de l'Aquaculture (CNRDPA) de Bou Ismail de la Wilaya de Tipaza.

I- Matériels :

Matériel biologique :

❖ Souches de microalgues :

Les souches de microalgues ont été prélevées par une équipe de chercheurs de CNRDPA à partir du lac El Goléa situé à Méria wilaya de Ghardaïa, en Octobre 2011. Les espèces ont été par la suite isolées et conservées dans des conditions bien déterminées (à l'état frais et à l'abri d'humidité).

	
<p>Figure 07: Photographie de la souche <i>Chlamydomonas</i> sp.</p>	<p>Figure 08: Photographie de la souche <i>Scenedesmus</i> sp.</p>

II- Méthodes :

II-1- Identification et entretien des microalgues :

II-1-1- Identification des microalgues :

Un fragment de chaque boîte contenant des espèces de microalgues a été déposé sur une lame dans une petite goutte d'eau physiologique, dans laquelle il a été réparti, une fois recouvert d'une lamelle, des observations aux différents grossissements ont été réalisées sous microscope optique.

L'identification des espèces a été réalisée en se basant sur les clés de détermination de **Bourrelly (1966)** ; **Iltis (1980)** ; **Hoff et Snell (2001)**. Deux espèces de microalgues ont été identifiées à savoir : *Chlamydomonas* sp et *Scenedesmus* sp.

II-1-2- Entretien des souches :

Les souches doivent être repiquées tous les quinze jours afin de les maintenir en bonne conditions. Cette durée entre chaque repiquage est idéale pour conserver des cellules jeunes avec un bon potentiel de multiplication (**Audineau, 1985**).

Le repiquage s'effectue sur milieu BG11 gélosé, (dont la composition figure en **Annexe 01**). Car tous les souches de microalgues unicellulaires peuvent bien pousser en milieu (BG11) (**Stanier et al., 1971**).

II-2- Purification des souches:

La contamination par des bactéries, des protozoaires ou d'une espèce d'algues est un problème grave pour les cultures mono-spécifiques ou axéniques de microalgues.

Les méthodes de purification ne sont pas difficiles, mais la préparation de cultures axéniques (sans bactéries) peut exiger la patience et la persévérance (**Stein, 1973**).

Tout d'abord les microalgues doivent croître dans leurs milieux, lorsque la culture est suffisamment dense, le traitement débute.

II-2-1- 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 sélectifs (**Reynold et Roger, 1977**).

- Pour l'espèce *Chlamydomonas*, le milieu choisi est le tri-acétate-phosphate (TAP) (dont la composition figure en **Annexe 02**), cela est justifié par son efficacité rapportée dans les travaux de recherche portant sur la culture de cette espèce (**Lembi, 1976**).
- *Scenedesmus* a été testée dans deux milieux de culture : Bold Basal (BBM) (**Jayashree et al., 2012**) (dont la composition figure en **Annexe 03**) et Bold Basal modifié (6NBBM), 6N : 6 fois concentré en azote. Ce milieu est caractérisé par sa richesse par rapport au BG11 (milieu de conservation) en certaines substances telles

que (KH_2PO_4 , FeSO_4 , K_2HPO_4 , H_3BO_4 ). Les milieux sont supplémentés par 10g/l du glucose (**Ogawa et Aiba, 1981**).

II-2-2-Choix du mode de nutrition:

Il a été choisi le mode photo-hétérotrophe pour la nutrition des espèces microalgales du fait du rendement plus significatif en biomasse engendré par ce mode en comparant avec le mode autotrophe et hétérotrophe rapporté par plusieurs auteurs.

II-2-3- Purification des souches de microalgues :

Dans des conditions aseptiques, sous la hotte et à côté du bec benzen des colonies de *Chlamydomonas* et *Scenedesmus* ont été prélevées à l'aide d'une pipette pasteur et introduites dans des tubes à essai contenant 10ml de leurs milieux de culture. Ils sont ensuite incubés dans des conditions favorables (température 25°C, lumière 3000 lux).

Pour avoir des souches microalgales pures on a effectué deux types de traitements :

II-2-3-1- Traitement par dilution :

Cette technique permet, d'évaluer le nombre de colonies bactériennes par ml de suspension. Elle peut permettre également, de réduire la contamination et avoir des souches pures. Si après dilution il apparaît toujours un nombre de colonies bactériennes on passe au traitement par les antibiotiques (**Sylvain Arnaud, 2010**).

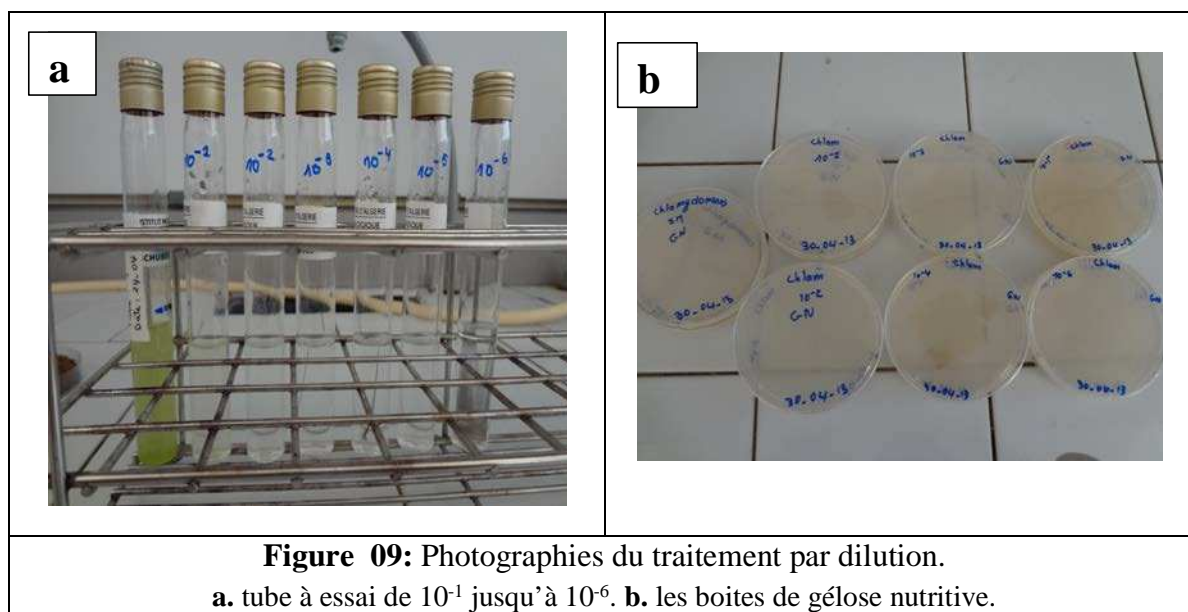


Figure 09: Photographies du traitement par dilution.
a. tube à essai de 10^{-1} jusqu'à 10^{-6} . **b.** les boîtes de gélose nutritive.

A partir d'un tube à essai contenant des microalgues dans leurs milieux de culture, des dilutions seront faites dans de l'eau physiologique.

- Marquer les tubes de diluant de (10^{-1} jusqu'à 10^{-6}).
- Prélever aseptiquement 1ml de la suspension mère à l'aide d'une pipette graduée stérile munie d'une paroi à aspiration : l'homogénéisation du prélèvement se fait par aspiration et refoulement trois fois (Norme NF ISO 7218).
- Transférer aseptiquement le ml prélevé dans le premier tube 10^{-1} , la pipette ne doit pas pénétrer dans les 9 ml de l'eau physiologique.
- A l'aide d'une deuxième pipette stérile procéder de la même façon du tube 10^{-1} au tube 10^{-2} .
- Faire la même pour les quatre derniers tubes, en utilisant à chaque prélèvement une pipette nouvelle.
- Déposer sur une boîte de Pétri contenant un milieu nutritif gélosé, 0.1 ml de chacune des dilutions indiquées.
- Etaler avec l'étalement de façon uniforme par un mouvement de balayage et de rotation sur l'ensemble de la surface de la gélose (ne pas ratisser la surface de la gélose).
- Laisser sécher les boîtes 10 min, les déposer ensuite à l'étuve et incuber à 37°C .
- Le dénombrement des colonies bactériennes a été effectué après 24 à 48 heures (Bonney et al., 2002).

II-2-2-2- Traitement par les antibiotiques :

Il a été adopté la procédure décrite par **hoshaw et Rosowski (1973)** pour le traitement par les antibiotiques.

∞ Etape 1 : préparation de la solution d'antibiotiques.

Immédiatement avant l'utilisation, on dissout 100 mg de pénicilline G (sel de Na) et 50mg de sulfate de streptomycine dans 10 ml d'eau distillée. On ajoute ensuite 10 mg de chloramphénicol, dissous dans 1 ml d'éthanol 95% et on mélange bien. La stérilisation de la solution préparée a été effectuée en faisant passer doucement la solution à travers un filtre à membrane stérile de $0,22\ \mu\text{m}$ (Figure 10.a) et la collecte du filtrat se fait dans un flacon stérile de 100 ml (Stein, 1973).

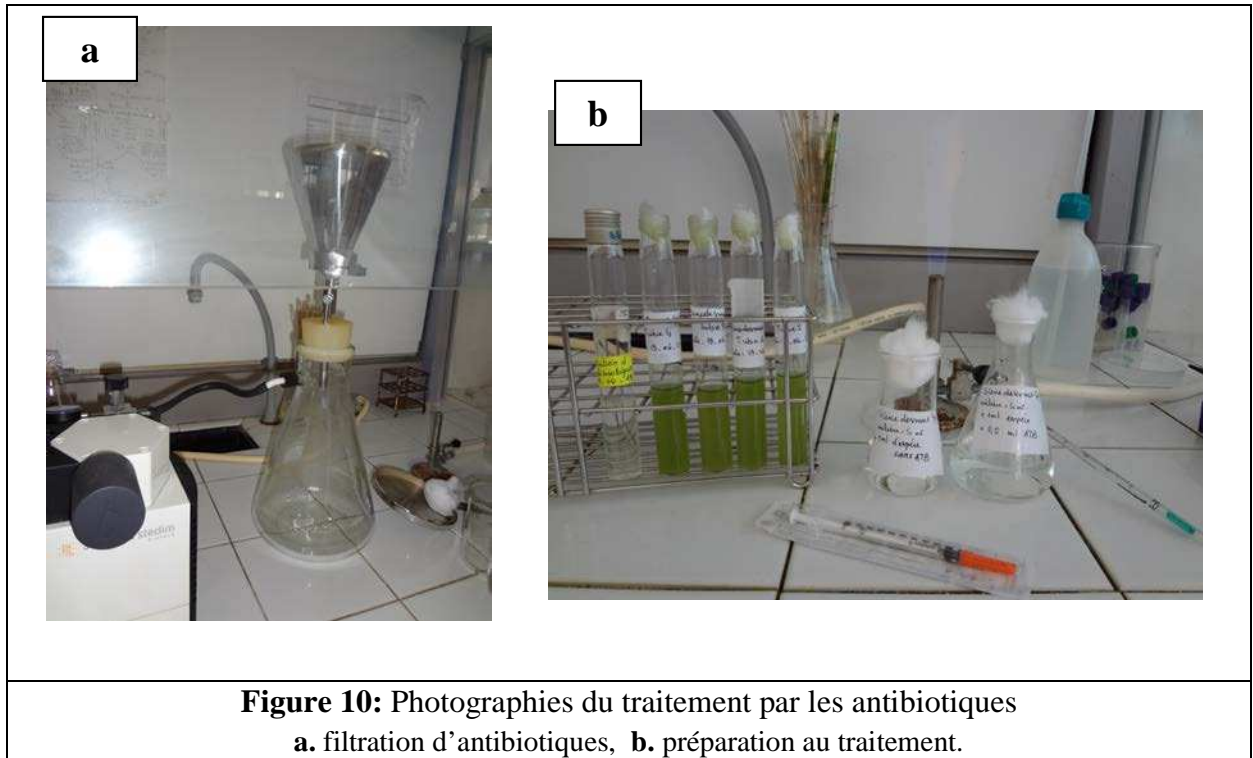


Figure 10: Photographies du traitement par les antibiotiques
a. filtration d'antibiotiques, **b.** préparation au traitement.

∞ Etape 2 : Traitement par antibiotiques.

- 1ml de la culture en tube a été aseptiquement transféré dans 2 Erlenmeyers de 100ml contenant 50ml du milieu de culture.
- Un Erlenmeyer ne doit pas contenir de l'antibiotiques et dans l'autre Erlenmeyer on a ajouté 0.5ml d'antibiotiques (**Stein, 1973 ; Andersen, 2005**).
- Les erlenmeyers ont été incubés en conditions favorables (lumière et température).
- Après 24 heures d'incubations, 4ml des deux Erlenmeyers ont été transférés dans des tubes de centrifugeuse stériles, les culots récupérés ont été lavés 2 fois par l'eau distillée stérile.
- A la fin, 0.1 ml du culot liquide a été prélevé et étalé sur gélose nutritive (GN), pour vérifier l'efficacité du traitement. Le reste du culot traité a été inoculé dans des boites de pétri contenant de BG11.
- Les boites de GN ont été incubées dans l'étuve à 37°C pendant 48h, tandis que les boites de BG11 ont été incubées en conditions favorables pour la croissance.
- Après 48h, un dénombrement se fait sur les boites de GN. Celles, où il y'a pas eu une croissance de bactéries, constituent les souches purifiés, seront utilisées pour l'inoculation de la culture.

II-3- Les étapes de la Culture des microalgues :

II-3-1- Mode de culture entrepris :

On a choisi la culture en batch pour suivre le développement et la croissance de nos cellules microalgales dans leurs milieux de culture.

Les souches pures des espèces de microalgues commencent à se multiplier dans de petits volumes et passent par différentes étapes jusqu'à la production en masse. Chaque étape implique une augmentation de volume de culture (**Lavens et al., 1996**).

II-3-2- Culture axénique :

➤ Inoculation initiale :

A partir d'une boîte de pétri contenant des microalgues pures, on a introduit des colonies dans des tubes à essai contenant 10 ml de milieu de culture liquide.

Selon la concentration d'algues, le volume de l'inoculum, correspond de manière générale à 2-10% du volume final de la culture (**Lavens et al., 1996**).

➤ Procédure de la culture :

Après une incubation de 5 jours, les tubes contenant l'inoculum servent à l'ensemencement des Erlenmeyers de 250 ml contenant 200 ml du milieu de culture. Ces derniers sont incubés 5 à 7 jours, et ils sont utilisés par la suite comme inoculum dans des Erlenmeyers de 1 litre contenant 600 ml de milieu de culture. Un Erlenmeyer de 1 litre est utilisée pour continuer la culture dans un jerrican de 5 litres, et l'autre est utilisée pour faire des analyses. La Figure 12 résume tous les étapes de la culture.

- ∞ Le repiquage se fait en zone stérile, à la flamme (bec benzen), avec désinfection préalable à l'alcool des mains, la paillasse, des goulots des tubes et Erlenmeyers.
- ∞ Les tubes et les Erlenmeyers servant au repiquage sont remplis avec de milieu de culture. Ils sont ensuite bouchés avec du coton et fermé avec du papier aluminium. Le tous a été autoclavé à 120°C pendant 10min. Une stérilisation de l'ensemble est indispensable pour éviter toute contamination.
- ∞ Un contrôle régulier sous microscope optique permet de s'assurer du non contamination des souches par d'autres souches ou par des bactéries, du fait d'une mauvaise stérilisation ou d'une erreur de manipulation- transfert de contamination.

II-3-3- Choix des conditions d'incubations :

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

- **Température d'incubation :** Toutes les souches microalgues eucaryotes en culture se développent de manière satisfaisante à 25°C (Allen et Stanier, 1968). Harris, (2009) a reporté que les espèces *Chlamydomonas* poussent bien dans une température entre 20°C - 25°C.
- **Lumière artificielle :** L'intensité lumineuse est généralement situer entre 2000 - 3000 lux à la surface de récipients de culture (Stanier et al., 1971).
- **Photopériode :** lumière/obscurité (24h / 0h) (Lavens et al., 1996).
- **Agitation :** L'agitation est faite pour les Erlenmeyers de 1litre en utilisant un barreau magnétique. Pour les jerricans de 5 litres l'agitation a été réalisée grâce à un secoueur.

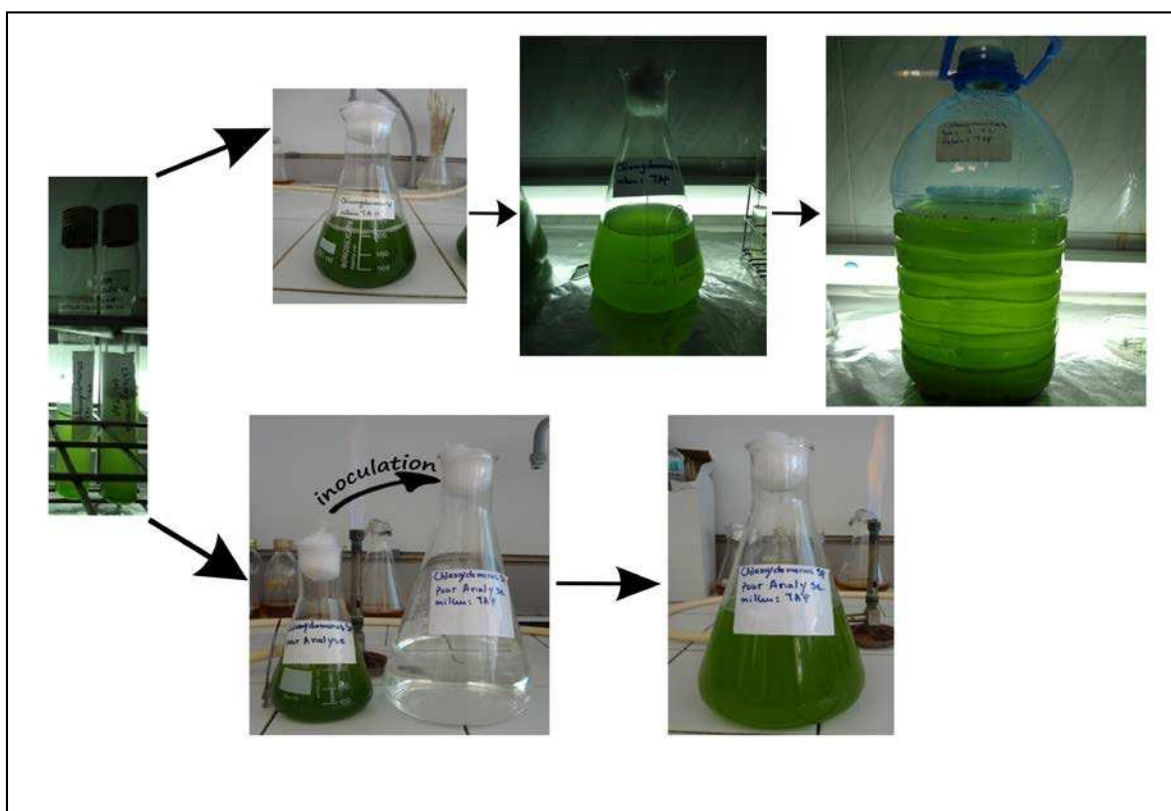


Figure 11: La culture de l'espèce *Chlamydomonas* sp

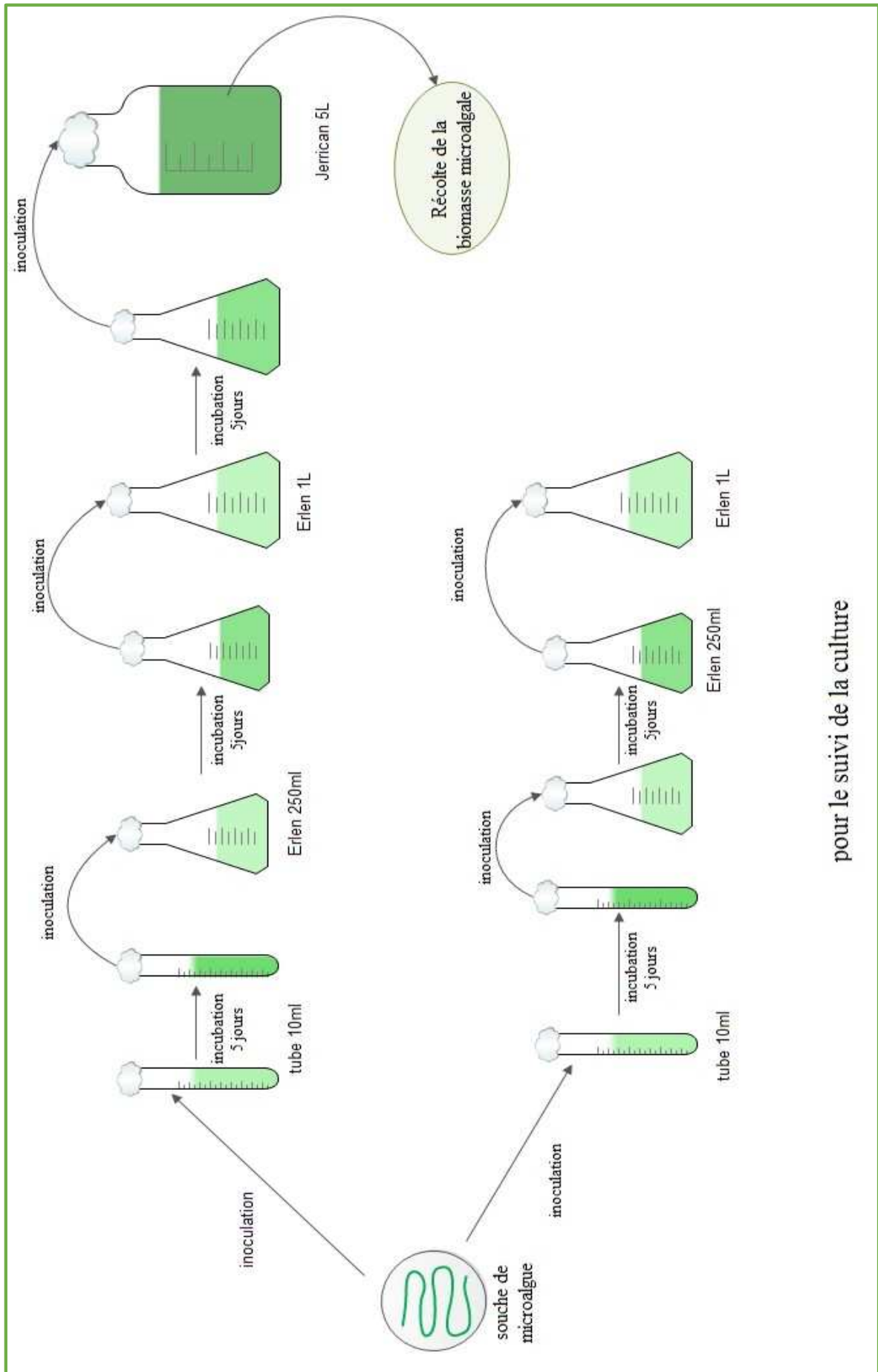


Figure 12: Schéma résumant les étapes pour la mise en route de la culture.

II-4- Analyse biométrique de la culture :

Il y a plusieurs moyens d'évaluation de la quantité de microalgues présentes dans les cultures, soit par comptage de nombre de cellules, soit par la densité optique (**Barnabé, 1989**).

Un Erlenmeyer de 1 litre contenant 800 ml de milieu de culture est utilisé pour faire les analyses suivantes :

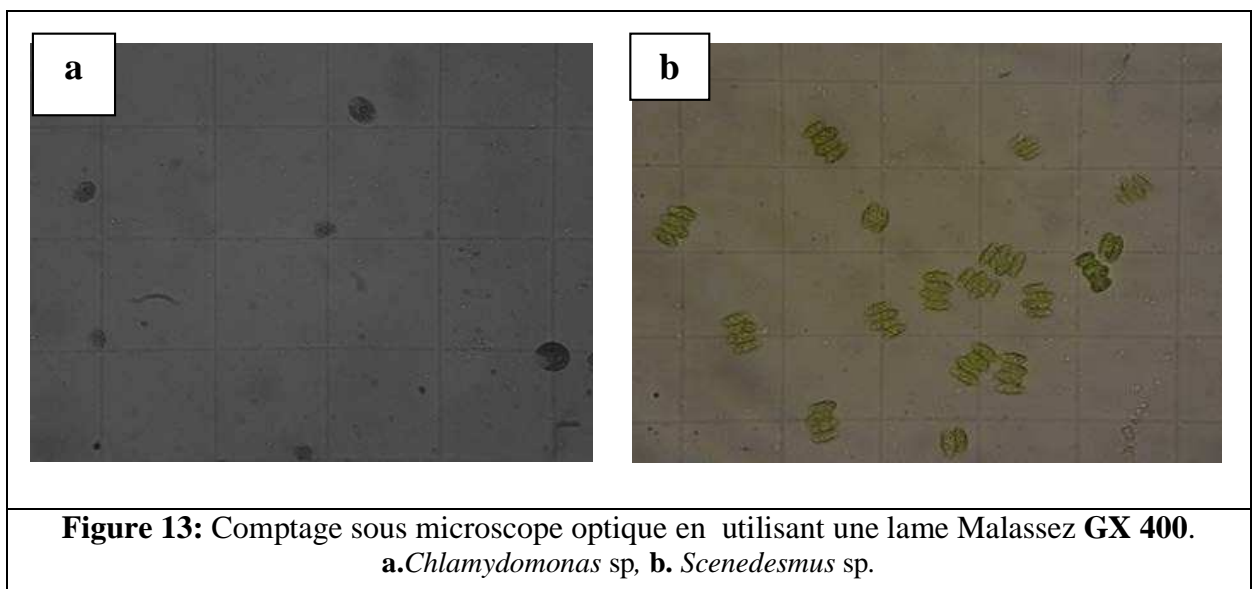
II-4-1- La densité optique :

La densité optique est mesurée dans un spectrophotomètre en suivant les étapes suivantes :

- On prélève à partir de l'erlenmeyer, avec la pipette pasteur stérile une quantité de milieu et le mettre dans une cuve en quartz.
- Mesurer la densité optique à la longueur d'onde de 680 nm (**Kropat et al., 2011 ; Devgoswami, 2011**).
- La courbe représente la cinétique de la croissance (l'absorbance en fonction du temps).

II-4-2- Comptage du nombre de cellules :

Le comptage se fait sous microscope optique à l'aide d'un hémacytomètre (lame Malassez) décrite en **Annexe 04 (Barnabé, 1989)**.



- Les microalgues sont prélevées à l'aide d'une pipette pasteur et introduites sur la zone de comptage (entre lame et lamelle) par capillarité.
- Le comptage des microalgues mobiles n'est possible que si elles sont préalablement tuées. pour ce faire on a ajouté trois gouttes du mélange (2ml du formol + 8ml d'eau distillé) dans 4ml de la culture microalgale (**Audineau, 1985**).

II-4-3- Dosage des chlorophylles :

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

Selon la souche de microalgue examinée, les solvants comme l'acétone (80% ou 100%), l'éthanol (**Sartory, 1982 ; Becker, 1994**) ou le diéthyléther (**Becker, 1994**) sont utilisés pour extraire le pigment des cellules de microalgues. Selon **Stewart (1974) ; Sartory (1982)** le méthanol est aussi utilisée comme un solvant pour l'extraction des pigments à partir des microalgues.

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 (**Becker, 1994**) :

- 1 - centrifuger 4ml de la culture microalgale à 4000 tour pendant 10 minutes et jeter le surnageant. En laissant que le culot qui contient les cellules microalgues qu'ils sont lavées avec de l'eau distillé et centrifuger une autre fois.
- 2 - Suspendre les cellules dans 4 ml de méthanol à (100%). Le tube est mis à l'obscurité. Les cellules se détruisent et 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 doit être protégé de la lumière pour éviter la décoloration des pigments.

La concentration de chlorophylle dans l'extrait est obtenue en lisant l'absorption de 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**) :

$$[\text{Ch}_a] = 16.72 \text{ DO}_{665.2} - 9.16 \text{ DO}_{652.4}$$

$$[\text{Ch}_b] = 34.09 \text{ DO}_{652.4} - 15.28 \text{ DO}_{665.2}$$

$$[\text{Ch}_{a+b}] = 1.44 \text{ DO}_{665.2} + 24.93 \text{ DO}_{652.4}$$

$$\text{Caroténoïdes} = (1000 \text{ DO}_{470} - 1.63 [\text{Ch}_a] - 104.96 [\text{Ch}_b]) / 221.$$

II-5- Calcul du taux de croissance spécifique :

C'est le taux de changement de la biomasse par unité de temps et par unité de biomasse. Ce qui revient à diviser la production par la biomasse. Sa dimension est donc « T⁻¹ »; si on choisit d'exprimer le taux de croissance en jours, on dira « par jour » ou « par 24h » (**Herbland, 2007**).

Le taux de croissance spécifique (μ , jour) a été mesuré en utilisant l'équation suivante (**Guillard et Ryther, 1962**):

$$\mu = \ln(N_t / N_0) / T_t - T_0$$

Où, N_t : nombre de cellules à la fin de la phase exponentielle.

N_0 : nombre de cellule au début de la phase exponentielle.

T_t : le dernier jour de la phase exponentielle.

T_0 : le premier jour de la phase exponentielle.

Si T exprimé en jours à partir du taux de croissance (μ) peut être convertie de division ou dédoublements par jour (k) en divisant (μ) par le logarithme népérien de 2 (0.6931) (**Devgoswami, 2011**) :

$$K = \mu / 0.6931$$

Où, K : nombre de division par jour.

μ : taux de croissance spécifique.

Le temps nécessaire pour parvenir à un doublement du nombre de cellules viables est nommé comme temps (T_t) qui est calculé par la formule suivante (**Devgoswami, 2011**) :

$$T_t = 0.6931 / \mu$$

II-6- La récolte :

A la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de la croissance des microalgues, la biomasse microalgale a été récupérée en utilisant deux techniques :

II-6-1- Centrifugation :

Dans des conditions aseptiques et à côté du bec benzen en utilisant des tubes à centrifugeuse stériles ; ils sont remplis avec de la culture (Figure 14.a) puis centrifugé à 5000 tour pendant 15min (Figure 14.b). Le milieu de culture est jeté en laissant que le culot qui contient des cellules microalgales. 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 a une température (- 4°C).

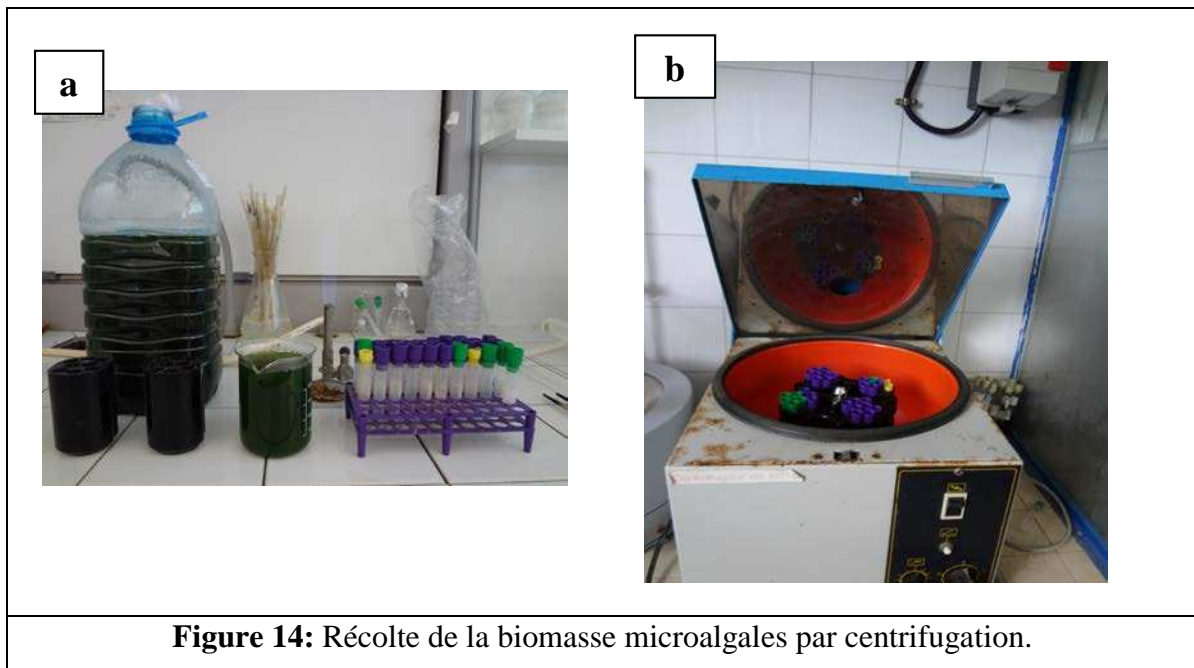


Figure 14: Récolte de la biomasse microalgales par centrifugation.

II-6-2- Filtration :

La filtration consiste à faire passer la culture parallèlement à la surface du filtre. C'est la pression de la pompe qui permet le 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 microalgues unicellulaires (**Person, 2010**).

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

∞ La procédure :

Dans les conditions aseptiques, après la stérilisation du récipient et le support de la membrane a filtré puis sous la hotte à côté du bec benzen, on place le récipient avec la pompe. On mit le filtre à sa place puis on verse la culture (Figure 15). Les cellules microalgales restent sur la membrane et le liquide traverse la membrane.



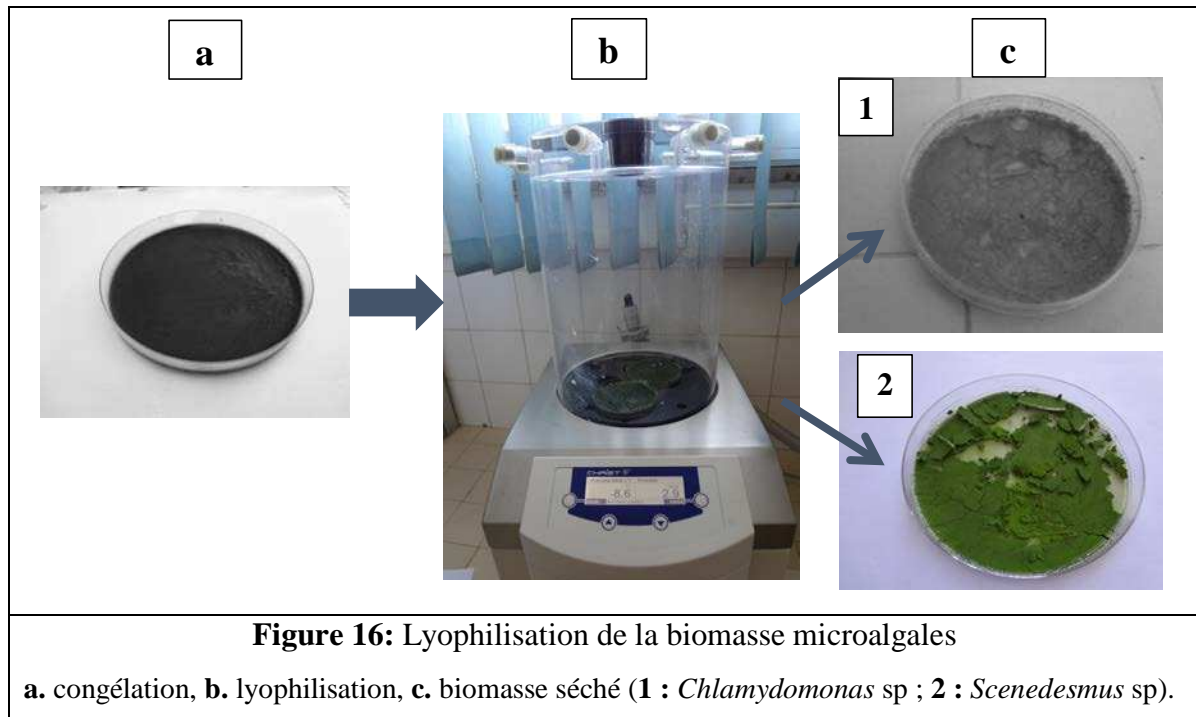
Figure 15: Récolte de la biomasse microalgales par filtration.

II-7-Lyophilisation :

La lyophilisation, ou anciennement appelée cryodessiccation, 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. 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**) :

- **la congélation :** pour solidifier l'eau de la matière microalgales où sont réfrigérés à une température -4°C ; l'eau se transforme alors en glace.
- **la dessiccation primaire :** sous vide, qui consiste à sublimer la glace libre (interstitielle), donc sans effet d'ébullition (pas d'eau en phase liquide).
- **la dessiccation secondaire :** qui permet d'extraire par désorption les molécules d'eau piégées à la surface des produits séchés.

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

II- 8- Analyse biochimique :

La composition chimique des algues n'est pas un facteur intrinsèque constant mais varie sur une large gamme. Plusieurs facteurs environnementaux influent sur la proportion des différents constituants de la biomasse algale. Variations extrêmes dans la composition

ont été signalés en réponse à des paramètres tels que la température, l'éclairage, la valeur du pH du milieu, nutriments minéraux, alimentation en CO₂, etc (**Becker, 1994**).

La teneur en glucides, lipides et protéines dans les biomasses microalgales ont été déterminées en utilisant les techniques suivantes :

II-8-1- Dosage des lipides :

Il a été adopté la méthode de **Folch** pour le dosage des lipides modifié par **Christie (1989)**.

- 0.5 g de poudre de microalgue est homogénéisée avec 10 ml de méthanol pendant 1 minute dans un mélangeur puis 20ml de chloroforme est ajouté et l'homogénéisation est poursuivie pendant 2 minutes de plus.

- Le mélange est filtré, lorsque le solide restant est remis en suspension dans environ 30 ml du mélange chloroforme-méthanol (2:1), on procède à une homogénéisation pendant 3 minutes. L'extrait est à nouveau filtré et lavé avec du solvant frais.

- Les filtrats réunis sont transférés dans une éprouvette, ajouter ensuite KCl 0.88% (p/v) à raison de 1/4 du volume total des filtrats afin d'obtenir 2 phases.

- La phase aqueuse (supérieure) est soutirée par aspiration. La phase organique est lavée avec un mélange méthanol- solution saline (1:1 v/v) à raison de 1/4 du volume de la phase organique. La procédure de lavage est répétée.

- La phase organique contenant les lipides a été aspirée et filtrée dans une quantité de sulfate de sodium (Figure a.17) avant que le solvant est éliminé dans un évaporateur rotatif à 68°C (Figure b.17).

- Les lipides sont stockés dans un petit volume de chloroforme à - 20 ° C, jusqu'à ce qu'il puisse être analysé.

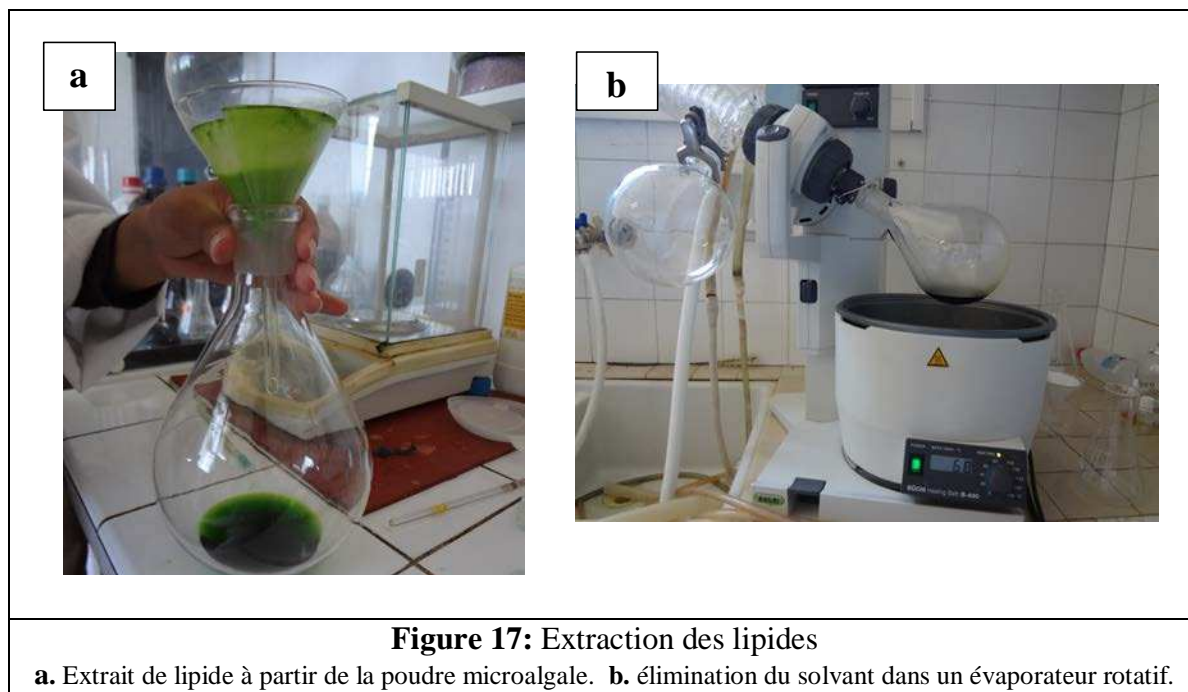


Figure 17: Extraction des lipides

a. Extrait de lipide à partir de la poudre microalgale. **b.** élimination du solvant dans un évaporateur rotatif.

∞ Calcul du rendement :

$$R = (\text{masse des lipides}/\text{masse de la poudre d'algue}) \times 100$$

II-8-2- Dosage des protéines :

La méthode préconisée est celle décrite par (**Lowry et al., 1951**), un sel de cuivre en milieu alcalin forme un complexe coloré avec les peptides. L'addition du réactif de folin-Ciocalteu (acide phosphotungstique et molybdique) produit une coloration bleu-foncé due à la fois à la réaction du cuivre sur les liaisons peptidiques et à la réduction de l'acide phosphotungstomolybdique par la tyrosine, le tryptophane et la cystéine.

➤ Réactifs :

Préparation des réactifs (Figure18.a) :

Réactif A : dissoudre 0.5g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ et 1g de citrate de sodium dans 100ml d'eau. Cette solution est stable indéfiniment (ce n'est pas le cas du mélange sulfate de cuivre et tartrate de la méthode originelle).

Réactif B : dissoudre 20g de Na_2CO_3 et 4g de NaOH dans 1 litre d'eau.

Réactif C : ajouter 1ml de réactif A à 50 ml de réactif B.

Réactif D : diluer 1 volume de réactif de Folin- Ciocalteu par 1 volume d'eau.

➤ **Protocole expérimental :**

Dissoudre 1 mg de la poudre d'algue dans 1 ml d'eau distillée, filtrer puis prélever 0.5ml de la solution à doser (contenant au maximum 0.5 mg de protéines). Ajouter 2.5 ml de réactif C mélanger et attendre 10min puis 0.25ml de réactif D est ajouté. Bien mélanger. Laisser la coloration se développe pendant 20-30 minutes à l'obscurité (Figure18.b). Lire l'absorbance à 685nm.

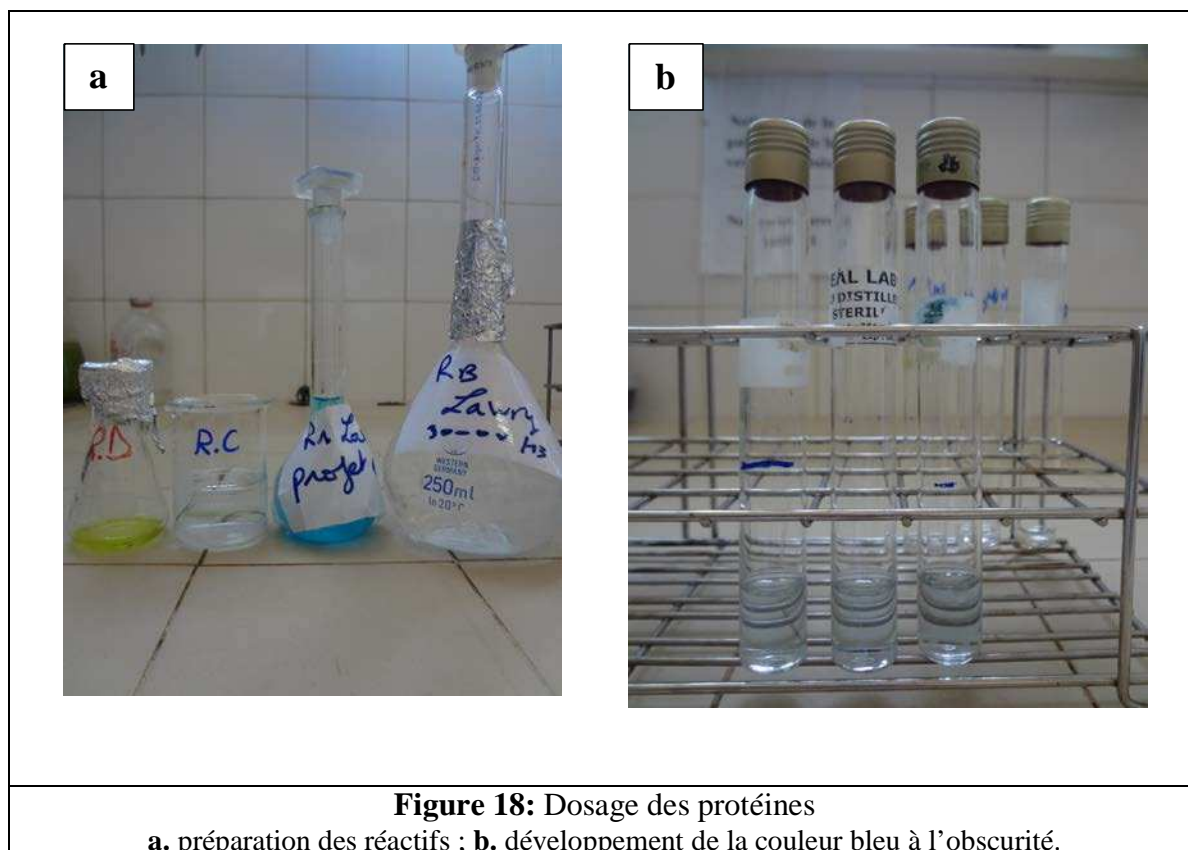


Figure 18: Dosage des protéines
a. préparation des réactifs ; b. développement de la couleur bleu à l'obscurité.

∞ La concentration des protéines en mg/l est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Concentration des protéines (mg/l)} = DO_{685\text{nm}} / 1.079$$

L'équation a été déterminée selon la courbe d'étalonnage.

II-8-3- Dosage des sucres totaux :

Les oses totaux sont dosés selon **Dubois et al., (1956)**, les glucides donnent une couleur orangée lorsqu'ils sont traités avec du phénol et concentrés par l'acide sulfurique. La réaction est sensible et la coloration est stable. Les glucides totaux sont ainsi dosés par

spectrophotométrie à 485nm. Une courbe d'étalonnage est effectuée à partir d'une solution de glucose.

➤ **La courbe d'étalonnage :**

Introduire 87.5mg du glucose dans 500ml d'eau distillée, préparer la solution de phénol à 5% (2.5g du phénol dans 47.5ml d'eau distillée). 5 tubes à essais sont remplis de la solution glucose (0ml, 2.5ml, 5ml, 7.5ml, 10ml) puis compléter avec de l'eau distillée. Ajouter 1ml de la solution phénol + 5ml H₂SO₄. Les mettre dans un bain marie à 30°C pendant 20min, les refroidir avec l'eau de robinet. Enfin mesurer de l'absorbance à 485nm et tracer la courbe d'étalonnage (Figure19).

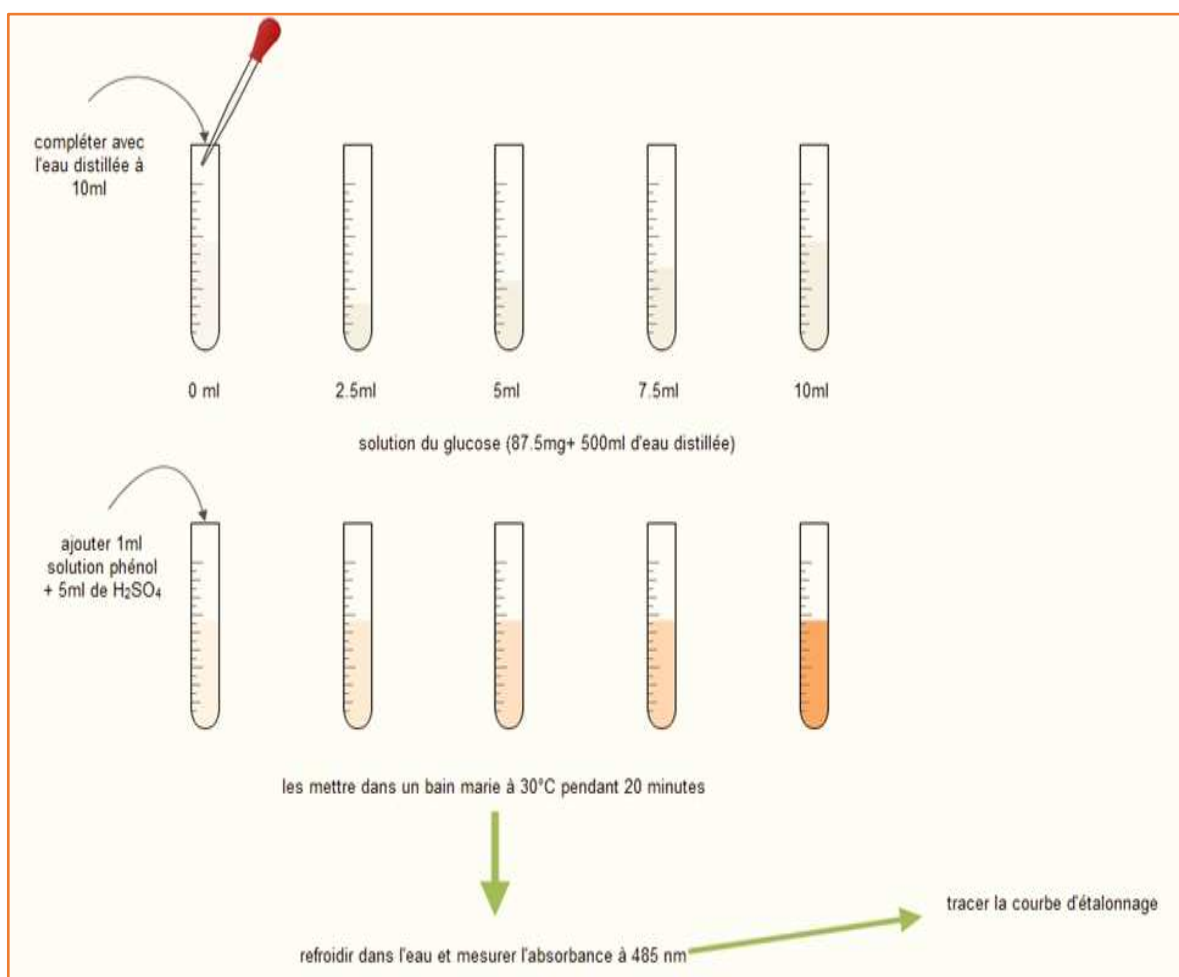


Figure 19 : Traçage de la courbe d'étalonnage des glucides.

➤ **Protocole expérimental :**

Préparer une solution à 0.2% (m/v) de la poudre de microalgue dans de l'eau distillée (Figure 20.a). Prélevée 2ml de la solution à doser est mis dans un tube à essai avec 1ml de phénol (à 5% dans l'eau). 5ml H₂SO₄ sont ajoutés rapidement sans les faire couler le long des parois et le mélange est agité immédiatement. Une coloration jaune se développe, stable durant plusieurs heures (Figure 20.b). Les tubes sont placés au bain-marie à 30°C pendant 20 minutes puis refroidis sous eau à 20°C. L'absorbance est mesurée à 485nm. Les teneurs sont déterminées en références à une gamme étalon de glucose.

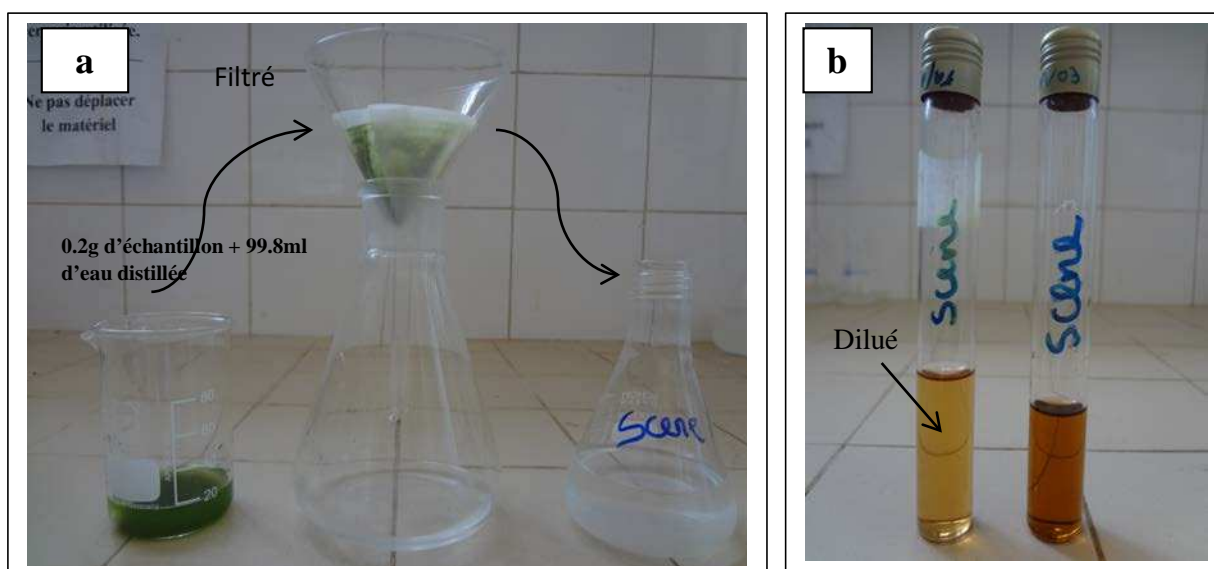


Figure 20: Dosage des glucides en poudres des microalgues.

3EME PARTIE :
RESULTATS ET DISCUSSIONS

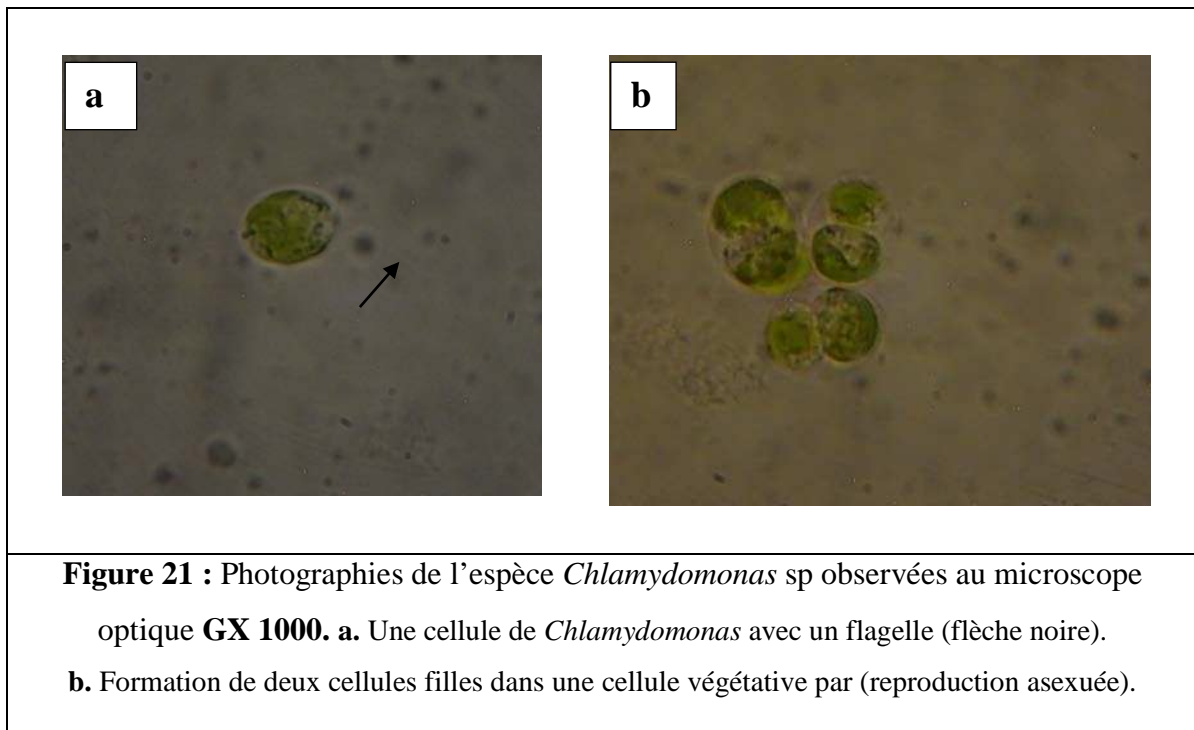
I- Identifications des souches :

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

Les clés de détermination de **Bourrelly (1966)** ; **Ittis (1980)** ; **Hoff et Snell (2001)** nous ont permis d'identifier deux genres d'espèces à savoir *Chlamydomonas* sp et *Scenedesmus* sp appartenant toutes au même phylum, les chlorophytes.

I-1-Espèce *Chlamydomonas* sp :

Chlamydomonas est une microalgue verte mobile, les cellules sont solitaires de forme ellipsoïde et les deux flagelles sortent de la papille membranaire (Figure 21-a) (**Bourrelly, 1966** ; **Ittis, 1980**). Selon (**Reviere, 2002**) la reproduction est asexuée (Figure 21-b).



I-2- Espèce *Scenedesmus* sp :

Scenedesmus est une microalgue verte non mobile, comprend de 2 jusqu'à 4 cellules ellipsoïdales ou fusiformes alignées coté à coté, 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 22-a) (**Bourelly, 1966 ; Iltis, 1980**).

La reproduction est montrée dans la Figure 22-b.

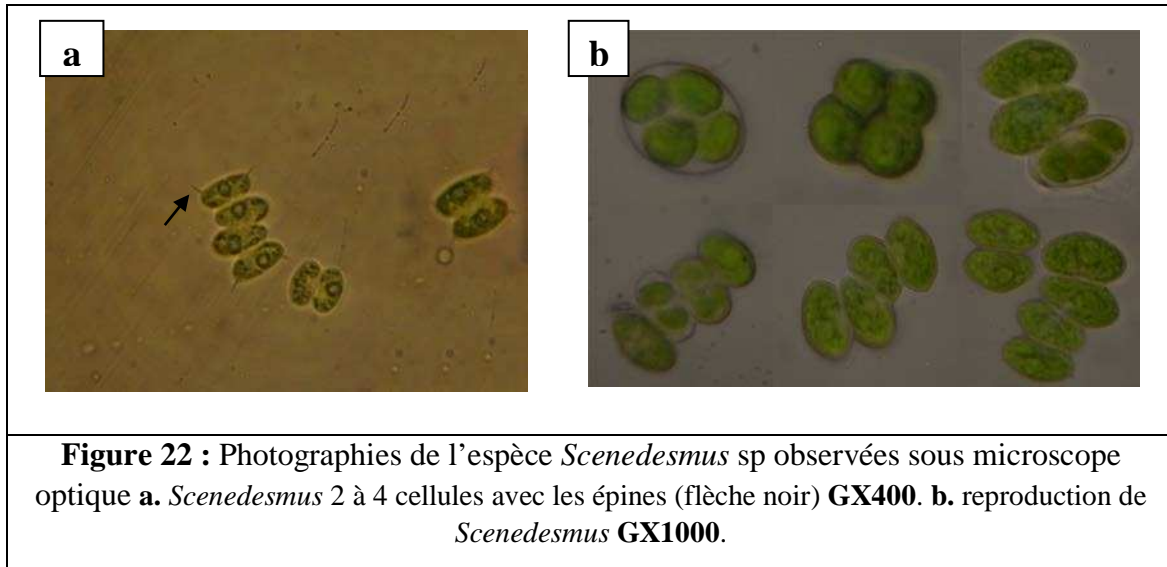


Figure 22 : Photographies de l'espèce *Scenedesmus* sp observées sous microscope optique **a.** *Scenedesmus* 2 à 4 cellules avec les épines (flèche noir) **GX400.** **b.** reproduction de *Scenedesmus* **GX1000.**

II- Culture des microalgues :

II-1- Choix du milieu de culture :

- Les résultats obtenus lors du choix du milieu pour *Scenedesmus* sp sont représentés sur la Figure 23. Ils montrent que les espèces de *Scenedesmus* sp ne peuvent pas se multiplier en milieu Bold Basal (BBM), cela est due à la concentration en nitrate de sodium (0.25g/l), elle est moins importante que celle du BG11 (1.5g/l). Pour garder la même concentration d'azote entre le milieu de conservation (BG11) et le milieu liquide BBM, ce dernier est modifié (6NBBM) en ajoutant 6X la concentration de NaNO_3 , la Figure 23 justifiée notre choix : culture plus dense en milieu 6NBBM.
- Concernant la culture de *Chlamydomonas* sp, l'efficacité du milieu Tris Acétate Phosphate (TAP) a été prouvée (Figure 24), cela montre que la composition chimique du milieu favorise parfaitement la croissance de notre espèce.

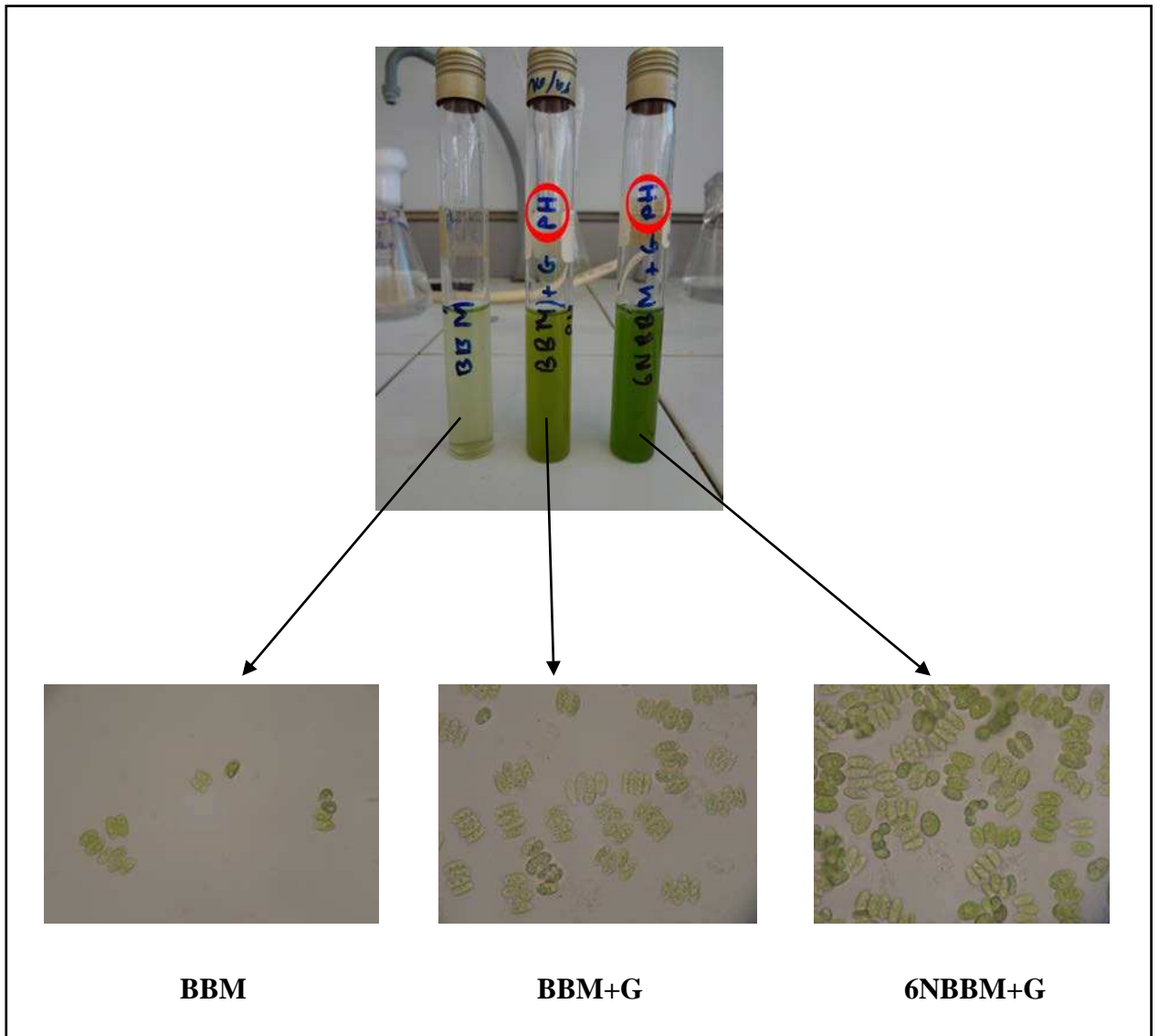
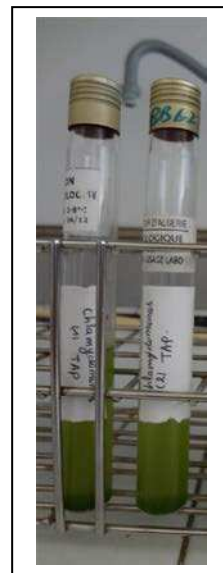


Figure 23 : Photographies de l'espèce *Scenedesmus* sp cultivée en BBM, BBM+G et 6NBBM+G.

PH : photohétérotrophe

G : glucose

Figure 24 : Photographie de *Chlamydomonas* sp dans le milieu de culture TAP.



II-2- Résultats des étapes de purification entreprises pour la mise en route de culture axénique :

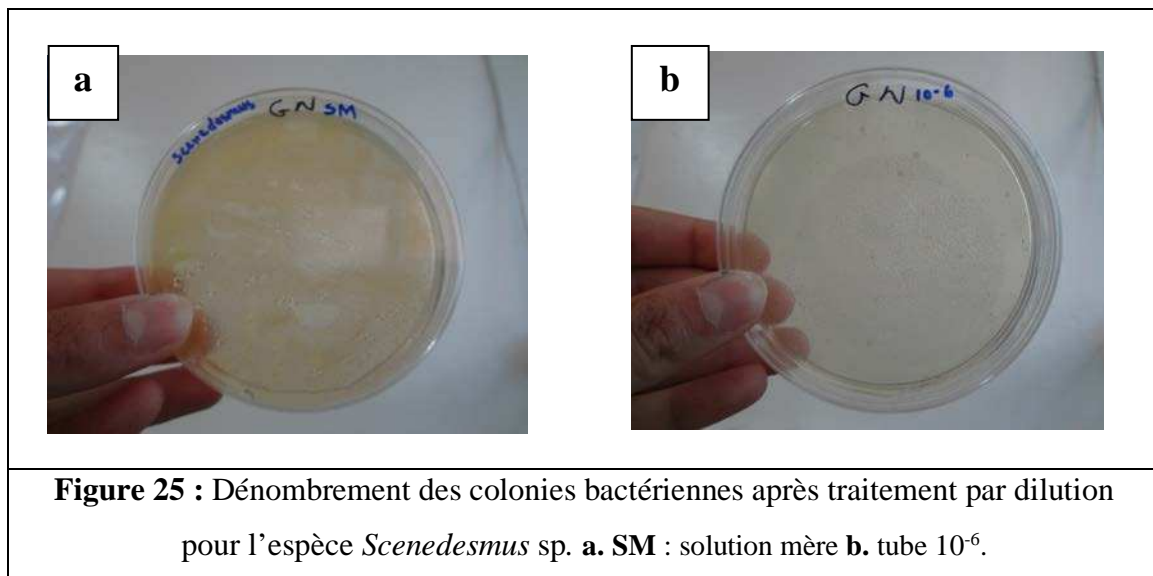
II-2-1- Résultats du traitement par dilution :

Les résultats du dénombrement des colonies bactériennes sont cités dans le tableau suivant :

Tableau I : Dénombrement des colonies bactériennes après traitement par dilution.

Espèces	<i>Chlamydomonas</i> sp	<i>Scenedesmus</i> sp
Tubes		
Inoculum initiale jusqu'au tube 10⁻⁵	Indénombrable	Indénombrable
Tube 10⁻⁶	40 UFC/ml	99 UFC/ml

UFC : unité formant colonie.



Les résultats montrent qu'il reste toujours un nombre élevé de bactéries après traitement par dilution. De ce fait le traitement par les antibiotiques s'avère une étape primordiale pour la suite de l'opération de purification.

II-2-2- Résultats du traitement par les antibiotiques :

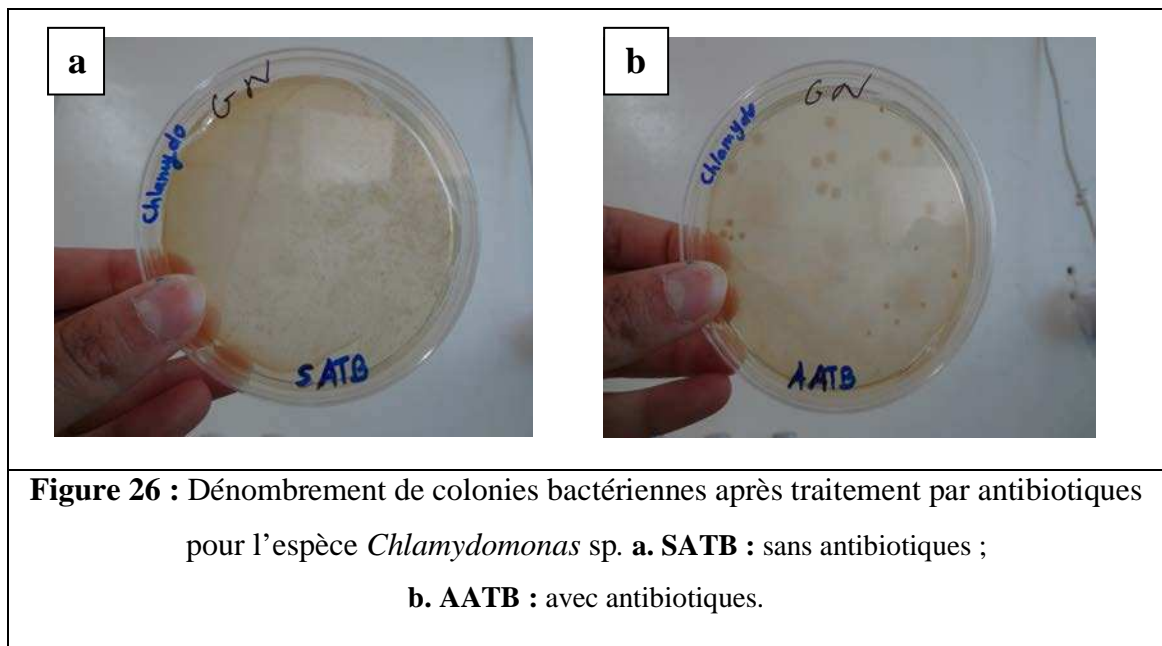
Les résultats du dénombrement des colonies bactériennes sont cités dans le tableau suivant :

Tableau II : Dénombrement des colonies bactériennes après traitement par antibiotiques.

Erlens \ Espèces	<i>Chlamydomonas sp</i>	<i>Scenedesmus sp</i>
Sans antibiotiques	Indénombrable	Indénombrable
Avec antibiotiques	21 UFC/ml	56 UFC/ml

UFC : unité formant colonie

Le dénombrement effectué sur les boîtes de gélose nutritif montre un nombre inférieur de colonies bactériennes que celui obtenu par dilution, cela est due à la solution d'antibiotiques dont la composition permette de couvrir tout le spectre bactérien. La pénicilline agissant sur les GRAM (+), la streptomycine agissant sur les GRAM (-), et le chloramphénicol ayant une action sur les deux (**Audineau, 1985**).



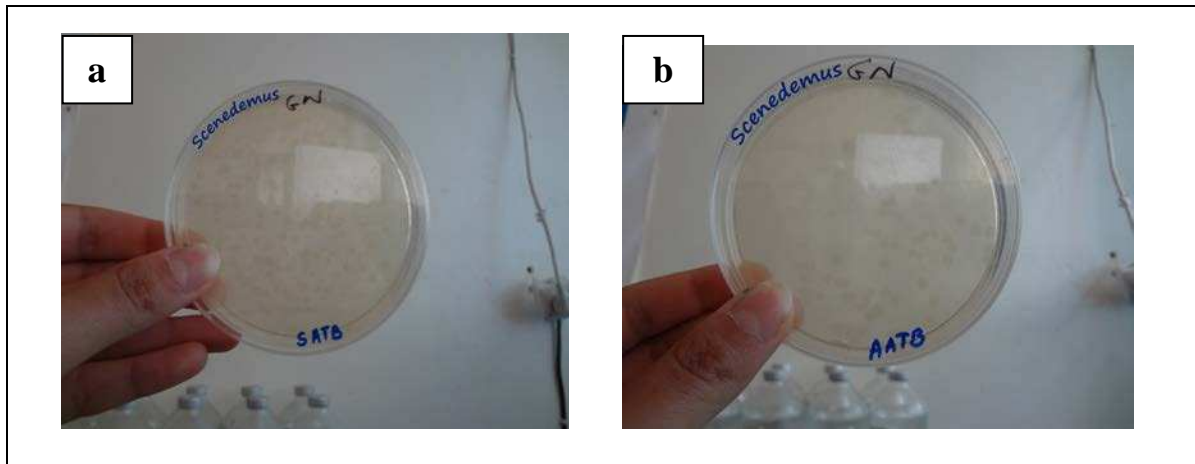


Figure 27 : Dénombrement des colonies bactériennes après traitement par antibiotiques pour l'espèce *Scenedesmus* sp. **a. SATB** : sans antibiotiques ; **b. AATB** : avec antibiotiques.

III- Résultats du suivi des cultures :

Les résultats obtenus des différentes analyses biométriques pour les deux cultures, seront traités séparément.

La cinétique de croissance des deux espèces, a été réalisée par la mesure de la densité optique à 680 nm pour *Chlamydomonas* sp (Kropat et al., 2011) et *Scenedesmus* sp (Devgoswami, 2011).

III-1- Cinétique de croissance de *Chlamydomonas* sp cultivée en milieu TAP :

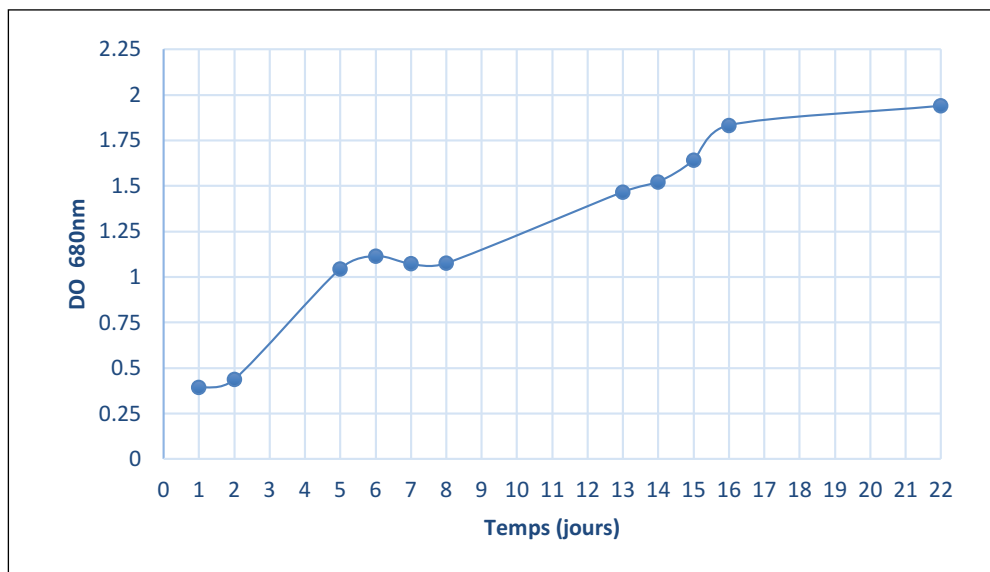


Figure 28 : Cinétique de croissance de *Chlamydomonas* sp cultivée en milieu TAP.

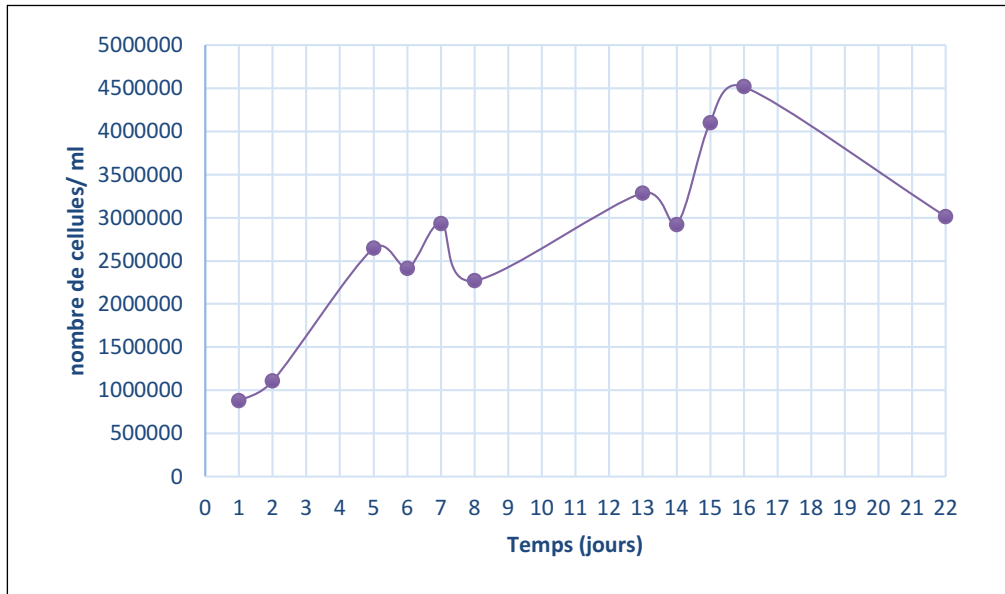


Figure 29 : Nombre de cellules de *Chlamydomonas* sp cultivée en milieu TAP.

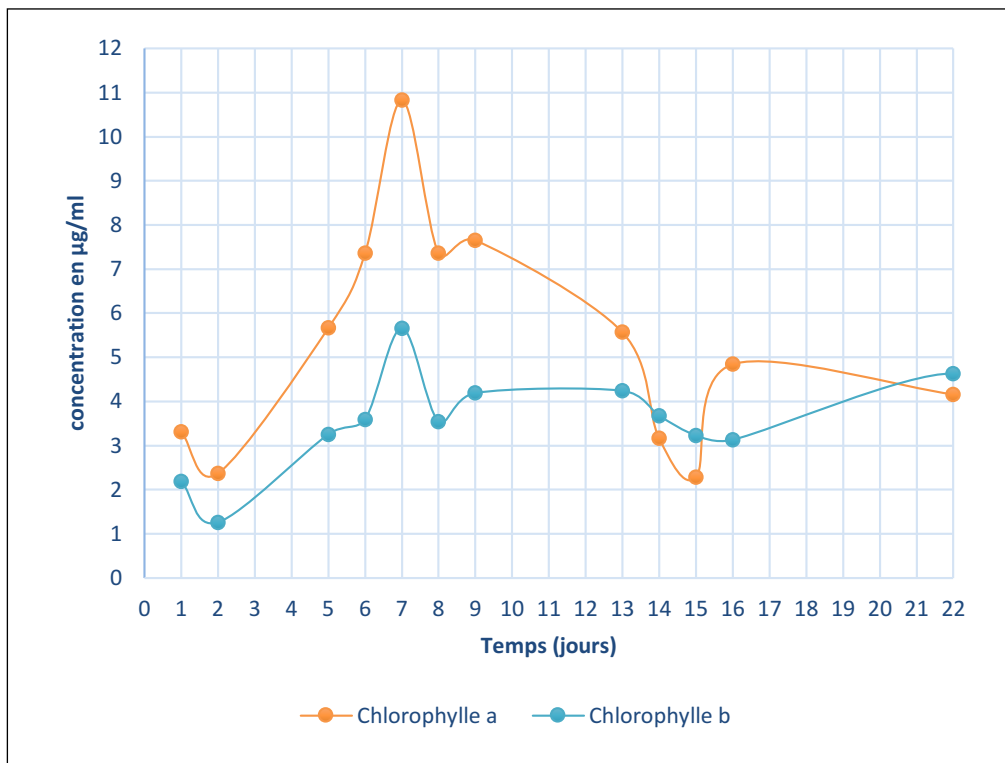


Figure 30 : Variation de la concentration en pigments photosynthétique de *Chlamydomonas* sp dans la culture en milieu TAP.

Les Figures 28 et 29 mentionnées ci-dessus montrent une relation entre l'absorbance lumineuse et le nombre des cellules microalgales.

La courbe de croissance est composée de 03 phases : la première prend 02 jours appelée phase d'adaptation durant laquelle une faible augmentation en nombre de cellules s'est produite, cela montre que les cellules de *Chlamydomonas* s'adapte rapidement au milieu liquide. La deuxième phase commence à partir du 2^{ème} jour jusqu'au 05^{ème} jour où il y'a eu une augmentation en nombre de cellule/ml allant du 11.04×10^5 au 26.44×10^5 , c'est la phase exponentielle dont la composition du milieu favorise positivement la multiplication de *Chlamydomonas*, on peut également justifier notre réponse par la teneur en chlorophylle (Figure30). Durant cette phase (exponentielle) l'augmentation de la teneur en chlorophylle est très rapide, elle passe de $2.36 \mu\text{g/l}$ au $5.66 \mu\text{g/l}$ pour la chlorophylle a et de $1.259 \mu\text{g/l}$ au $3.25 \mu\text{g/l}$ pour la chlorophylle b. Nous avons effectivement observés que la couleur de la culture a changé passant d'un vert clair, à un vert foncé indiquant une activité photosynthétique. La dernière phase définie comme stationnaire, entprend le 05^{ème} jour caractérisé par des élévations et diminutions renouvelées en nombre de cellules, sans variation significative, ce phénomène est due à une diminution de la quantité des nutriments dans le milieu de culture plus précisément l'azote et le phosphore comme il a été indiqué par (Porpatham, 2007).

III-2- Cinétique de croissance de *Scenedesmus* sp cultivée en milieu 6NBBM+G :

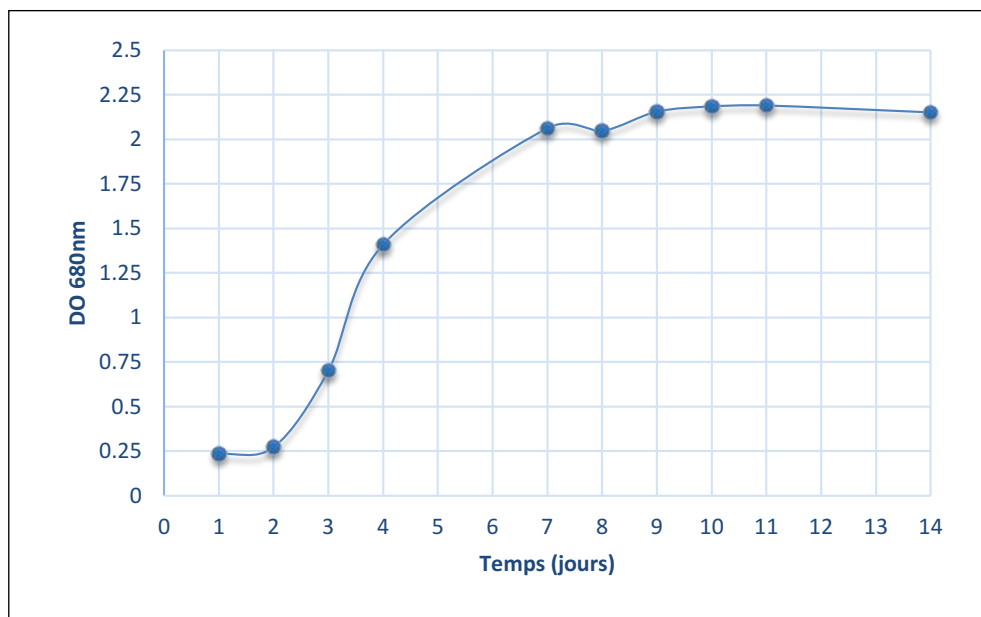


Figure 31 : Cinétique de croissance de *Scenedesmus* sp cultivée en milieu 6NBBM+G.

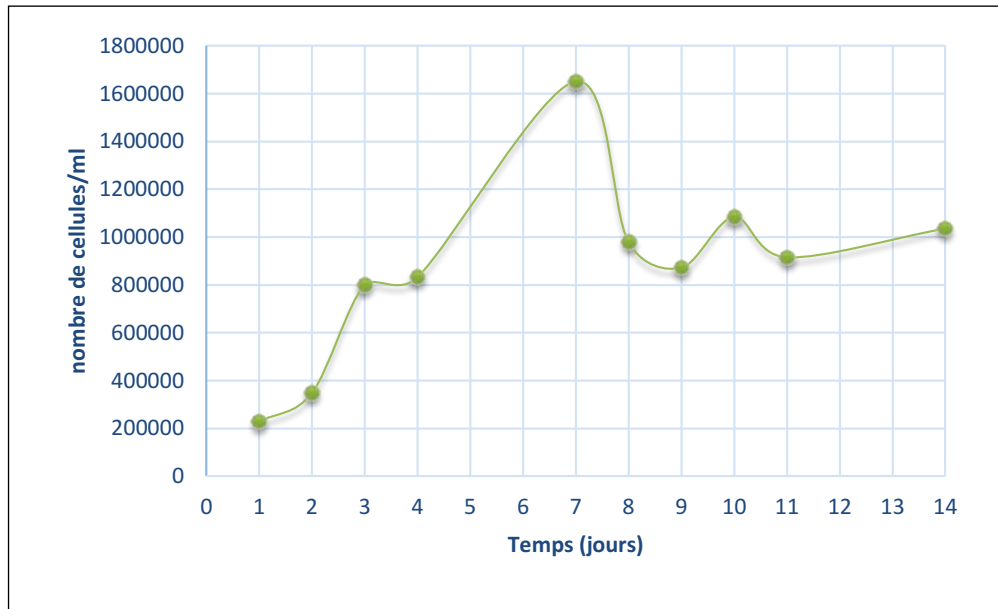


Figure 32 : Nombre de cellules de *Scenedesmus* sp cultivée en milieu 6NBBM+G.

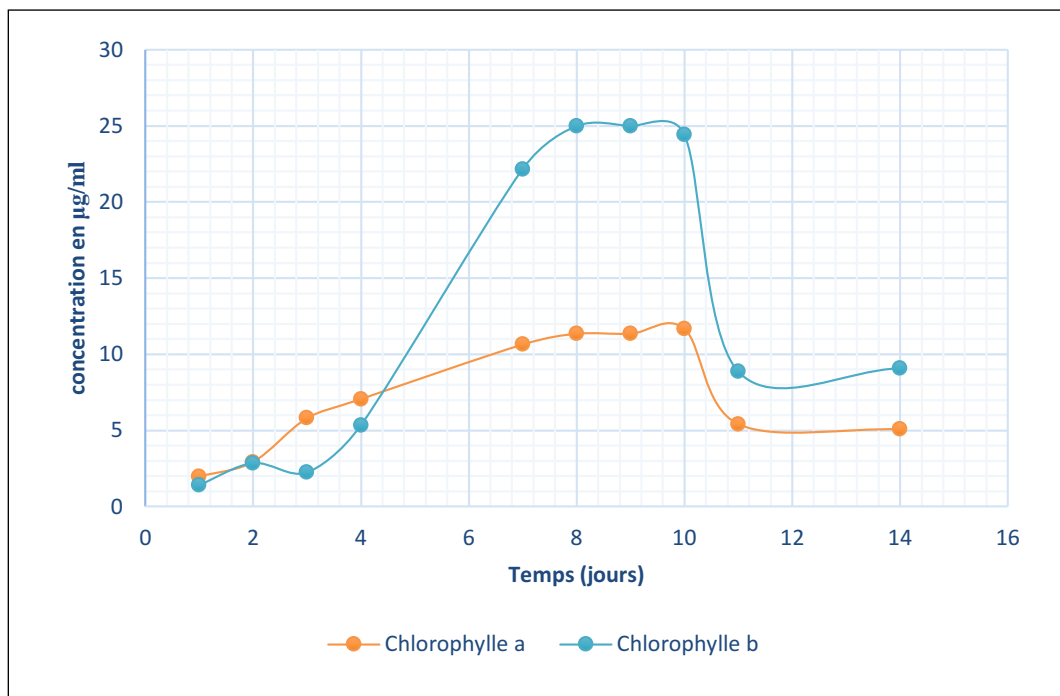


Figure 33 : Variation de la concentration en pigments photosynthétique de *Scenedesmus* sp dans la culture en milieu 6NBBM+G.

La courbe est composée de trois phases (Figure31) : la première débute du 01 au 2^{ème} jour, c'est la phase d'adaptation. La phase exponentielle a commencé le 2^{ème} jour et s'étend jusqu'au 7^{ème} jour, ceci est justifiée par un accroissement important du nombre de cellules du 3.48×10^5 au 16.52×10^5 cellules/ml due aux conditions de culture idéales « disponibilité

des nutriments ». La chlorophylle (a) a également subis cette variation il passe de 2.93 $\mu\text{g/ml}$ au 10.65 $\mu\text{g/ml}$, tandis que la chlorophylle (b), l'élévation a été entreprise le 3^{ème} jour (2.25 $\mu\text{g/ml}$) jusqu'au 8^{ème} jour (24.97 $\mu\text{g/ml}$) (Figure 33). Cette teneur est plus élevée vis-à-vis de la chlorophylle (a), ce qui explique la couleur verte-jaunâtre de notre culture de *Scenedesmus*. En ce qui concerne la troisième phase, stationnaire, elle a commencé le 7^{ème} jour, où il a été observé une variation minime du nombre de cellules due à la diminution des nutriments dans le milieu.

IV- Détermination du taux de croissance spécifique :

Tableau III : Résultat de calcul de taux de croissance spécifique des deux cultures.

Espèces	μ (j^{-1})	K (division /jour)	T_t (jour)
<i>Chlamydomonas</i> sp	0.29	0.42	2.39
<i>Scenedesmus</i> sp	0.31	0.44	2.23

Le taux de croissance spécifique obtenu dans notre culture de *Chlamydomonas* sp est de (0.29 j^{-1}) soit 0.42 division par jour. Le taux déterminé est inférieur à la valeur (0.33 j^{-1}) obtenue par **Hadiyanto (2012)**.

Le tableau montre que toutes les cellules de *Chlamydomonas* peuvent parvenir à une division en prenant 2 jours de temps.

Dans le cas de *Scenedesmus* sp, il est de (0.31 j^{-1}) soit 0.44 division par jour, ce taux est pratiquement identique à celui révélé par **(Jayashree et al., 2012)** qui vaut (0.38 j^{-1}) en culture autotrophe avec une photopériode de (16h / 8h) et dans le même milieu BBM.

Le temps de doublement indique que les cellules de *Scenedesmus* peuvent se diviser toutes les 2 jours.

V- Analyse biochimique :

Les analyses biochimiques ayant effectuées sur les poudres de microalgues séchées nous ont donné les résultats suivants :

V-1- Dosage des lipides :

$$\text{Extrait de lipide (g)} = (\text{ballon} + \text{lipide}) - \text{ballon vide.}$$

Tableau IV : Rendement des espèces en lipides.

Espèces	Extrait de lipide (g)	Rendement (%)
<i>Chlamydomonas sp</i>	0.09	18
<i>Scenedesmus sp</i>	0.4	80

V-2- Dosage des protéines :

$$\text{Quantité de protéines (mg/l)} = \text{DO}_{685 \text{ nm}} / 1.079$$

Les résultats de mesure à la densité optique **685 nm**.

Tableau V : Résultats de l'absorbance à 685nm.

Absorbance Espèces	Tube 1	Tube 2	Tube 3	Moyenne
<i>Chlamydomonas sp</i>	0.1399	0.1025	0.1247	0.12236
<i>Scenedesmus sp</i>	0.0672	0.0623	0.0820	0.0705

Tableau VI : Rendement des espèces de microalgues en protéines.

Espèces	Quantité de protéines (mg)	Rendement (%)
<i>Chlamydomonas sp</i>	0.1134	11.34
<i>Scenedesmus sp</i>	0.0653	6.53

V-3- Dosage des sucres totaux :

Les résultats de la courbe d'étalonnage cités dans le tableau suivant :

Tableau VII : Absorbances de la solution de glucose.

	Solution de glucose (mg/ml)				
Concentration	0 (blanc)	43.75	87.5	131.25	175
Abs (485 nm)	0	0.2596	0.2694	0.3745	0.5948

La courbe d'étalonnage :

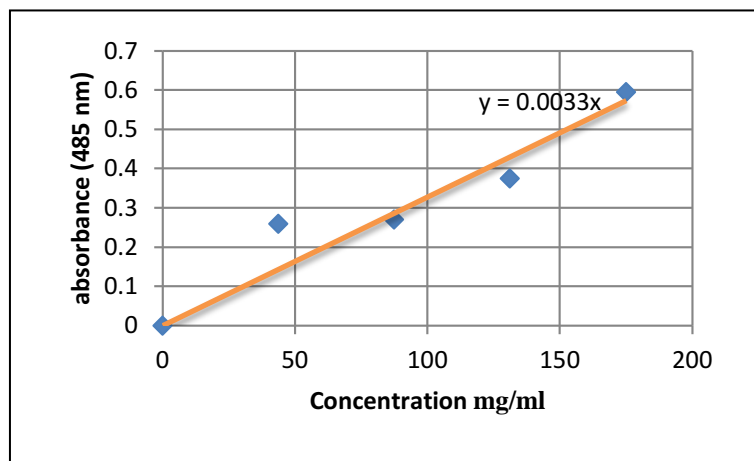


Figure 34 : Courbe d'étalonnage des glucides.

Tableau VIII : Rendement des espèces de microalgues en glucides.

Espèces	Quantité de glucides (mg/l)	Rendement (%)
<i>Chlamydomonas</i> sp	93.06	4.65
<i>Scenedesmus</i> sp	352.26	17.61

❖ **Discussion sur les résultats de la composition biochimique des microalgues :**

Chlamydomonas sp :

Tableau IX : Résultats de la composition biochimique de *Chlamydomonas* sp.

Auteurs	Espèces	Protéines %	Glucides %	Lipides %
Nos résultats	<i>Chlamydomonas</i> sp	11.34	4.65	18
Feinberg, 1984	<i>Chlamydomonas</i> sp	17	59	23
Becker, 1994	<i>Chlamydomonas rheinhatdii</i>	48	17	21

En comparaison, la composition en protéines et en lipides de nos espèces de *Chlamydomonas* sp est faible par rapport aux travaux de **Feinberg, 1984** et **Becker, 1994**. Une très faible teneur en glucides est également distinguée.

***Scenedesmus* sp :**

Tableau X : Résultats de la composition biochimique de *Scenedesmus* sp.

Auteurs	Espèces	Protéines %	Glucides %	Lipides %
Nos résultats	<i>Scenedesmus</i> sp	6.53	17.61	80
Becker, 1994	<i>Scenedesmus obliquus</i>	50 -56	10-17	12-14
	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47	/	1.9
	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40
Voltolina et al., 1999	<i>Scenedesmus</i> sp	33	27	12
Hua Chang Hong, 2008	<i>Scenedesmus obliquus</i>	65.5	27.4	7.10

En comparaison, les résultats mentionnés dans le tableau sont différents. Notre espèce de *Scenedesmus* cultivée en 6NBBM en mode photohétérotrophe nous a donné une teneur très élevée en lipides de (80%), cette quantité est supérieure vis-à-vis de toutes les données rapportées par les auteurs. Les conditions de culture engendrent un rendement très faible en protéine de 6.53 % en comparant avec celui déterminé par les autres auteurs. La teneur en glucides est faible et proche à celle obtenue par **Becker, 1994**.

Tableau XI : Données récapitulatives en substances bioactives de *Chlamydomonas* sp et *Scenedesmus* sp.

Espèces	Protéines %	Glucides %	Lipides %	Total %
<i>Chlamydomonas</i> sp	11.34	4.65	18	33.99
<i>Scenedesmus</i> sp	6.53	17.61	80	100

Conclusion

Le présent travail a porté sur l'identification, la culture et l'analyse biochimique de deux espèces de microalgues d'eau douce (*Chlamydomonas* sp, *Scenedesmus* sp), isolées à partir du lac El-Goléa, en vue d'une application nutritionnelle en aquaculture (alimentation des zooplanctons, filtreurs (moules) et larves de poissons).

Dans le cadre de la réalisation de notre étude : la maîtrise des cultures des microalgues passe par un travail rigoureux et constant tant sur le plan de la surveillance que sur le plan de la manipulation. Le bon maintien des souches est primordial car il conditionne toute la suite de la production.

Les résultats obtenus montrent que le traitement par les antibiotiques étant la méthode de choix pour la purification des espèces de microalgues, il permet de réduire au maximum les contaminants.

L'étude a prouvé que la composition des milieux de culture BBM et TAP favorisent respectivement la croissance de *Scenedesmus* sp et *Chlamydomonas* sp ceci est justifié par les taux de croissance parvenus. Tandis que la teneur de la biomasse algale en molécules bioactives y compris protéines, glucides et lipides est plus importante dans *Scenedesmus* sp (~100 %) que dans *Chlamydomonas* sp (~34 %). De ce fait on peut conclure que la composition du milieu de culture et les conditions d'incubation (température et lumière) influent fortement sur la composition biologique de la biomasse.

Enfin il serait avantageux d'entreprendre d'autres études à fin de renforcer nos résultats :

- Le changement du mode de nutrition de *Chlamydomonas* sp, culture en mode hétérotrophe pour améliorer le rendement en substances bioactives.
- Application nutritionnelle de la biomasse algale produite par *Scenedesmus* sp en raison de sa teneur très élevée en lipides.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

Allen M.M et Stanier R.Y., 1968. Selective isolation of blue-green algae from water and soil. *J.gen. Microbiol.* 51, p 203-209.

Amblard C., 1991. Activité hétérotrophe des microalgues et des cyanobactéries vis-à-vis du carbone: implications écophysiological. *Ann. biol.* 30 (2): 74-107. In: Dabbadie L., 1992. *Cultures intensives de microalgues sur lisier de porc : performances, contraintes, utilisation des biomasses.* Diplôme d'agronomie approfondie. Mention : production animale. ENSA de Montpellier, France : p 18.

Andersen R.A., 2005. Algal culturing techniques. Elsevier Academic press USA: p125-126.

Audineau, B., 1985. Production d'algues unicellulaires. IFREMER bibliothèque de Palavas.

Barnabé G., 1989. Aquaculture (volume1). Ed Lavoisier : p184- 201.

Becker E. W., 1994. Microalgae : biotechnology and microbiology. Cambridge University Press, p177- 195.

Becker W., 2004. Microalgae in human and animal nutrition. In: Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology, Richmond A. (ed.), Blackwell Publishing Ltd., Oxford, p 312- 351.

Bonnefoy C., Guillet F., Layrel G., Verne - Bourdais E., 2002. Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaires. Wolters Kluwer, Paris, France : p 45.

Bourrelly P., 1966. Les algues d'eau douce. Initiation à la systématique. Tome 1: les algues vertes. Collect. Faunes et Flores actuelles, Editions N. Boubée, Paris: p26-28, 45-51, 208-217.

Cantin Isabelle., 2010. La production de biodiesel à partir des microalgues ayant un métabolisme hétérotrophe. Essai présenté au Centre Universitaire de Formation en Environnement en vue de l'obtention du grade de maître en environnement. Sous la direction de Guy Viel. Université de Sherbrooke, Québec, Canada : p 13.

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.

Chader S., 2003. Le génie des microalgues: de l'aliment au carburant bulletin des énergies renouvelables. p9.

Christie William W., 1989. Gas Chromatography and Lipids. The Oily Press. The Hannah Research Institute, Ayr, Scotland: p 15- 16.

Dabbadie L., 1992. Cultures intensives de microalgues sur lisier de porc : performances, contraintes, utilisations de biomasse. Diplôme d'agronomie approfondie. Mention : production animale. ENSA de Montpellier, France : p13- 19.

Dangeard A.P., 1921. Observations sur une algue cultivée à l'obscurité depuis huit ans. C.R. hebd. Séances acad. sci. 172: 254-260.

Danxiang H., B. Yonghong and H. Zhengyu, 2004. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products – Species of high potential: Nostoc, In: Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology, Richmond A. (ed.), Blackwell Publishing Ltd., Oxford, p 304-311.

Devgoswami Ch.R., Kalita M. C., Talukdar J., Bora R., Sharma, P., 2011. Studies on the growth behavior of Chlorella, Haematococcus and Scenedesmus sp. In culture media with different concentrations of sodium bicarbonate and carbon dioxide gas. African Journal of Biotechnology Vol. 10(61), pp. 13128-13138.

Doré-Deschênes François., 2009. Utilisation des microalgues comme source d'énergie durable. Essai présenté au Centre Universitaire de Formation en Environnement en vue de l'obtention du grade de maître en environnement. Centre universitaire de formation en environnement université de sherbrooke. Longueuil, Québec, Canada : p 15- 16.

Droop M.R., 1974. Heterotrophy of carbon. In: STEWART W.D.P (ed), Algal physiology and biochemistry. Univ. Calif. press, Los Angeles: p 530-559.

Dubois F., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F., 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Analytical Chemistry, 28, 350-356.

Feinberg Daniel A., 1984. Fuel options from microalgae representative chemical compositions. United States of America: p 10.

Fogg G.E., 1953. The metabolism of algae. London, Methuen. (Collection Methuen's monographs on biological subjects). p149.

Fogg G.E., 1987. Algal Cultures and Phytoplankton Ecology. 3eme edition. The University of Wisconsin Press, Ltd. London, England: p57.

Fox R.D., 1999. Spiruline, Technique, pratique et promesse. Edisud, France.

Gouveia L., Nobre B.P., Marcelo F.M., Mrejen S., Cardoso M.T., Palavra A.F., Mendes R.L., 2007. Functional food oil coloured by pigments extracted from microalgae with supercritical CO₂. Food Chemistry, Volume 101, p 717-723.

Guillard R.R.L., Ryther J.H., 1962. Studies on marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confere* (Cleve) Gran. Can. J. Micro. 8: 229-239.
In: Devgoswami Ch R., Kalita M. C., Talukdar J., Bora R., Sharma, P., 2011. Studies on the growth behavior of *Chlorella*, *Haematococcus* and *Scenedesmus* sp. in culture media with different concentrations of sodium bicarbonate and carbon dioxide gas. African Journal of Biotechnology Vol. 10(61), p 13128-13138.

Harris Elizabeth H., 2009. The Chlamydomonas Sourcebook: Introduction to Chlamydomonas and Its Laboratory Use, Volume 1. Elsevier Academic press. p 248.

Hadiyanto., Sumarno., Rufaida Nur Rostika., Noer Abyor Handayani., 2012. Biofixation of Carbon dioxide by *Chlamydomonas* sp. in a Tubular Photobioreactor. Chemical Engineering Department, Faculty of Engineering, Diponegoro University, Indonesia. Journal of Renewable Energy Development 1:10-14.

Herbland A., 2007. La culture du phytoplancton dans les bassins aquacoles

Aspects théoriques et applications pratiques. Ifremer –Département Aquaculture en Calédonie : p 4 -7.

Hoff F.H., Snell.T.W., (2001). Plankton culture manual. 5^{ème} édition. Florida Aqua Farms, Inc. USA. p 4 -7, 11-20, 27-57.

Hoshaw R.W., Rosowski J.R., 1973. Methods for microscopic algae. In: Handbook of phycological methods: Culture methods & growth measurements, Stein J.R(ed). Cambridge university press, USA: p 62-63.

Hua Chang Hong., Asit Mazumder., Ming Hung Wong., Yan Liang., 2008. Yield of trihalomethanes and haloacetic acids upon chlorinating algal cells, and its prediction via algal cellular biochemical composition. Elsevier Ltd. water research 42, 4941–4948.

Iltis André., 1980. Les algues. In : Durand J-R et Leveque C. (1980). Flore et faune aquatiques de l’Afrique sahélo - soudanienne. Tome I. éditeur ORSTOM, p 9-31.

Jayashree J., Manoranjan N., Himansu S. P., Nilotpala P., Chandragiri S., Prasanna Ku. Panda., Bhamidipati V. S. K Rao, Rachapudi B. N. Prasad, Lala Behari Sukla., 2012. Microalgae of Odisha Coast as a Potential Source for Biodiesel Production. World Environment 2012, 2(1): p 11-16.

Kropat J., Hong-Hermesdorf A., Casero D., Petr Ent., Castruita M., Pellegrini M., Merchant Sabeeha S., Malasarn D., 2011. A revised mineral nutrient supplement increases biomass and growth rate in *Chlamydomonas reinhardtii*. The Plant Journal (2011)66, p 770–780.

Kim M. K., Park J.W., Park C.S., 2007. Enhanced production of *Scenedesmus spp.* (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater. Bioresource Technology 98, p 2220–2228.

Laing I., 1991. Cultivation of marine, unicellular algae. Laboratory Leaflet. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food Directorate of Fisheries Research, Lowestoft, (67): p 13-14.

Lavens P., Sorgeloos P., 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture FAO Fisheries Technical Paper.No. 361. Rome, FAO. 1996. p 7-42.

Lembi Carole A., 1976. Green Algae: A Source of Single Cell Protein. Ardent Media: p186.

Lichtenthaler H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes. *Meth. Enzyme.* 148, p 350-382. *In:* Wellburn A.R., 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J plant physiol.* Vol. 444, p 307-313.

Lowry., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological Chemistry*, 193, 265-275.

Marker A.F.H., 1972. Some problems arising from the estimation of chlorophyll a and pheophytin a in methanol. Great Britain, p 578- 579.

Marin Michèle., René Frédéric., 2000. Lyophilisation. F3240

Mayer A.M.S., Lehmann V.K.B., 2001. Marine pharmacology in 1999: antitumor and cytotoxic compounds. *Anticancer Research*, 21, p 2489–2500.

Melis A., Happe T., 2001. Hydrogen production: Green algae as a source of energy, *Plant Physiology*, 127, p 740-748.

Moreau D., Tomasoni C., Jacquot C., Kaas R., Le Guedes R., Cadoret J-P., Muller-Feuga A., Kontiza I., Vagias C., Roussis V., Roussakis C., 2006. Cultivated microalgae and the carotenoid fucoxanthin from *Odontella aurita* as potent anti-proliferative agents in bronchopulmonary and epithelial cell lines. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 22, p 97-103.

Morice G., Jamma C., 1992. De l'or vert à la tonne. *Sci. Et vie* 894: 96-99. *In :* Dabbadie Lionel., 1992. Cultures intensives de microalgues sur lisier de porc : performances, contraintes, utilisation des biomasses. Diplôme d'agronomie approfondie. Mention : production animale. ENSA de Montpellier, France : p32.

Neilson A.H., Lewin R.A., 1974. The uptake and utilization of organic carbon by algae: an essay in comparative biochemistry. *Phycol.* 13 (3): 227-264. *In:* Dabbadie Lionel., 1992. Cultures intensives de microalgues sur lisier de porc : performances, contraintes, utilisation des biomasses. Diplôme d'agronomie approfondie. Mention : production animale. ENSA de Montpellier, France : p 18.

Nicholes H. W., 1973. Growth media freshwater. In: handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements, Stein Janet R., Cambridge University Press, USA. p 7-24.

Ogawa T., Aiba S., 1981. Bioenergetic analysis of mixotrophic growth in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*. Biotechnol. Bioeng., 23, 1121–32. In: Richmond A., 2004. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, p 117.

Person J., 2010. Livre Turquoise : Algues, filières du futur. Colloque Algues : filières du futur. Adebitech, Romainville : p 21- 22.

Porter K.G., 1988. Phagotrophic phytoflagellates in microbial food webs. Hydrobiol.159: p 89-97.

Porpatham E., Ramesh A., Nagalingam B., 2007. Effect of Hydrogen Addition on the Performance of a Biogas Fuelled Spark Ignition Engine. Int J Hydrogen Energy 32: 2057–2065. In: Hadiyanto., Sumarno., Rufaida Nur Rostika., Noer Abyor Handayani., 2012. Biofixation of Carbon dioxide by Chlamydomonas sp. in a Tubular Photobioreactor. Chemical Engineering Department, Faculty of Engineering, Diponegoro University, Indonesia. Journal of Renewable Energy Development 1:10-14.

Reviere B., 2002. Biologie et phylogénie des algues. Tome1. Col. Belin Sup Science. Paris : p199.

Reynaud P. A. et Roger P. A., 1977. Milieux sélectifs pour la numération des algues eucaryotes, procaryotes et fixatrices d'azote. Biol. Sol, 1977, 14 (3): 421-428.

Richmond A., 2004. Handbook of microalgal culture-biotechnology and applied phycology. Blackwell science Ltd. Oxford, UK. 566, p228- 230.

Sartory David P., 1982. Spectrophotometric analysis of chlorophyll a in freshwater phytoplankton. Department of Water Affairs Hydrological Research Institute. Republic of South Africa. p 10- 19.

Siaut M., Cuiiné S., Cagnon C., Fessler B., Nguyen M., Carrier P., Beyly A., Beisson F., Triantaphylidès C., Li-Beisson Y., Peltier G., 2011. Oil accumulation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* : characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. BMC Biotechnology, 11:7.

Stanier R. Y., Kunisawa R., Mandel M., Cohen B., 1971. Purification and properties of unicellular blue - green algae (order Chlorococcales). Bacteriological Reviews, Vol. 35, pp. 171-205.

Starckx Senne., 2012. A place in the sun - Algae is the crop of the future, according to researchers in Geel. Flanders Today [en ligne]. Page consulté le 5avril2013 <http://www.flanderstoday.eu/content/place-sun>

Stein Janet R., 1973. Handbook of phycological methods: Culture methods & growth measurements. Cambridge university press, USA: p 53-66.

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

Stewart William Duncan Patterson., 1974. Algal Physiology and Biochemistry. University of California Press. Berkeley and Los Angeles, California: p161- 175.

Spotte S.H., 1979. Seawater Aquariums: The captive environment, Wiley-Interscience, New York, N.Y., 413p. *In*. Hoff F and Snell.W.T, 2001. Plankton culture manual. 5^{ème} edition. Florida Aqua Farms, USA: p32.

Thurman H. V., 1997. Introductory Oceanography. New Jersey, USA: Prentice Hall College.

Toyub M.A., Miah M.I., Habib M.A.B and Rahman M. M., 2008. Growth performance and nutritional value of *Scenedesmus obliquus* cultured in different concentrations of sweetmeat factory waste media. Department of Fisheries, Ministry of Fisheries and Livestock, Bangladesh: p 86 – 93.

Voltolina D., Cordero B., Nieves M., Soto L.P., 1999. Growth of *Scenedesmus sp.* in artificial wastewater. Bio resource Technology, Volume 68, Number 3, p. 265-268(4).

Wiedeman V.E., 1970. Heterotrophic nutrition of waste-stabilization pond algae. *In*: J.E. ZAJIC, Properties and products of algae. Proc. symp. Cult. Algae, Plenum Press, New-York-London: 107-114. *In* : Dabbadie L., 1992. Cultures intensives de microalgues sur lisier de porc : performances, contraintes, utilisation des biomasses. Diplôme d'agronomie approfondie. Mention : production animale. ENSA de Montpellier, France : p 17.

Yuan-kun Lee and Hui Shen., 2004. Basic Culturing Techniques. In: In: Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology, Richmond A. (ed.), Blackwell Publishing Ltd., Oxford, p 40-56.

ZAJIC J.E., CHIU Y.S., 1970. Heterotrophic culture of algae. In: J.E. ZAJIC, Properties and products of algae. Proc. symp. Cult. Algae, Plenum Press, New-York-London: p 1-47.

Sites d'internet :

(Borowitzka Michael A, 2011) : <http://www.bsb.murdoch.edu.au/groups/beam/BEAM-App10.html>

Cronodon, 2007 : http://cronodon.com/images/Scenedesmus_labeled.jpg

Guillard, 1957 : <https://ncma.bigelow.org/node/1/strain/CCMP222>

Kojima S et al.,

1995 : <http://protist.i.hosei.ac.jp/pdb/images/chlorophyta/scenedesmus/Scenedesmus.jpg>

Sylvain Arnaud, 2010 :

<http://pedagogie.ac-toulouse.fr/svt//serveur/labo/techniques/5steril.html>

ANNEXES

ANNEXE 01:

La composition du milieu BG11 (Stanier et *al.*, 1971) :

Milieu BG11 (g/l) :

Solutions stocks	Masse (g/l)
NaNO ₃	1.5
KH ₂ PO ₄ .3H ₂ O	0.04
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.075
CaCl ₂ . 7H ₂ O	0.036
Acide citrique	0.006
Citrate ammoniac ferrique	0.006
EDTA	0.001
Na ₂ CO ₃	0.02
Solutions A5	1ml
Agar	13g

Solutions A5	Masse (g/l)
H ₃ BO ₄	2.86
MnCl ₂ .4H ₂ O	1.81
Cl ₂ Co. 6H ₂ O	0.049
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.222
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.079
(NH ₄)MoO ₇ O ₂₄ . 4H ₂ O	0.39

- Le PH est ajusté à 7,4 avant autoclavage (120°C pendant 20min).
- Pour les cultures solides 13 g d'agar sont ajoutées à 1 litre de milieu avant autoclavage.

ANNEXE 02:**Le milieu Tris – Acétate – Phosphate (TAP) (Andersen, 2005) :**

Pour 1L de milieu :

Solution 2X Filner's Beijernicks	25 mL
1M Potassium Phosphate	1 mL
Trace minéral solution	5 mL
Tris-base	2.42 g
Acide Acétique Glacial (17.4 mM acétate)	1 mL

PH doit être de 7.2

2X Filner's Beijernicks solution (500 mL)

NH ₄ Cl	8g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2g

Ajuster avec l'eau distillée 500ml et stocker à 4°C après autoclavage.

Trace minéral solution (500mL)

5 g disodium EDTA – dissout dans 400 ml d'eau avec chauffage sous agitation

Neutraliser à PH 6.5 avec du NaOH = 5N

Puis ajouter les sels suivants un à un, une fois le sel complètement dissout.

FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.5g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2.2 g
H ₃ BO ₃	1.14 g
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.51 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.016 g
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.073 g
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.016 g

Compléter à 500ml puis autoclavé (la solution est vert pale puis devient de couleur pourpre).

1M Potassium Phosphate Stock (50mL)

20 ml 1M stock KH₂PO₄ (1M stock: 6.8g/ 50ml)

30 ml 1M stock K₂HPO₄ (1M stock: 8.7g/ 50ml)

PH = 7.2

Pour les cultures solides 13 g d'agar sont ajoutées à 1 litre de milieu avant autoclavage.

ANNEXE 03:

Le milieu de culture Bold basal (NICHOLAS H.W, 1973)

	Solutions stocks		g pour 1litre	Pour 1 litre du milieu
Macronutriments	6 solutions mères	1. NaNO ₃	25	10 ml
		2. CaCl ₂	2.5	10 ml
		3. MgCl ₂	7.5	10 ml
		4. K ₂ HPO ₄	7.5	10 ml
5. KH ₂ PO ₄		17.5	10 ml	
6. NaCl ₂		2.5	10 ml	
	Solution EDTA alcalinisée	7. EDTA	50	1ml
		KOH	31	
	Solution acidifiée de fer	8. FeSO ₄ . 7H ₂ O	4.98	1ml
		H ₂ SO ₄	1 ml	
	Solution de bore	9. H ₃ BO ₄	11.42	1ml
Micronutriments		10. ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8.82	1ml
		MnCl ₂ . 4H ₂ O	1.44	
		(NH ₄)MoO ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0.71	
		CuSO ₄ . 5H ₂ O	1.57	
		CaCl ₂	0.49	

- Ajouter 10ml de chaque solution stocke (de 1 à 6) à 940 ml d'eau distillé.
- Ajouter 1 ml de solutions 7 à 10.
- Autoclavage à 120°C pendant 15 minutes.

ANNEXE 04 :

Description de la cellule Malassez (Josette Najjar, 2012) :

La **cellule de Malassez** est un hématimètre qui permet de compter le nombre de cellules en suspension dans une solution. Il s'agit d'une lame de verre sur laquelle un quadrillage a été gravé de 25 rectangles contenant eux-mêmes 20 petits carrés. Elle a été inventée par Louis-Charles Malassez.

Cellule de Malassez :

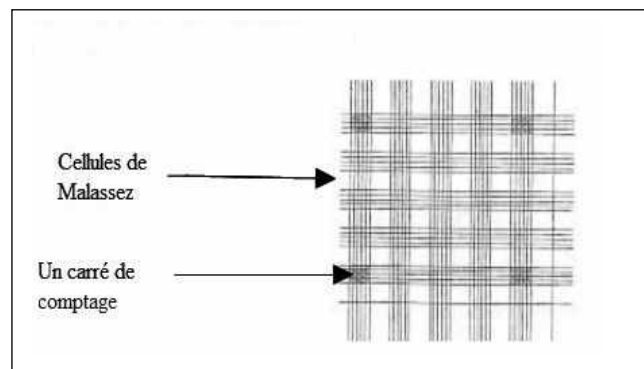
Volume du quadrillage total : 1 μ l

Dimensions d'une bande : L : 2,5 mm, l : 2 mm, H (ou profondeur) : 0,20 mm

Constitué de : 100 rectangles d'égales surfaces.



Lame Malassez



Quadrillage de la cellule Malassez

Les étapes de comptage de cellules : (Yves GILLE, Antoine Pierson, 2010)

1. Homogénéiser le liquide à analyser.
2. Entre hématimètre et lamelle, laisser rentrer, par capillarité, une goutte de l'échantillon à énumérer grâce à une pipette Pasteur.

(La goutte ne doit pas déborder dans les rigoles de l'hématimètre et la goutte doit recouvrir complètement et d'un seul coup toute la surface quadrillée de l'hématimètre).

Attendre au moins 5-10 minutes, avant d'entreprendre le comptage (les éléments cellulaires doivent sédimenter).

Dénombrement :

1. Observer à l'objectif x10 pour repérer la position du quadrillage, et vérifier l'homogénéité de la répartition des cellules à compter.

2. Observer ensuite à l'objectif x40 pour réaliser le comptage (1 rectangle par champ).
3. Réalisez le comptage des cellules dans le premier cadre.

Il existe une convention indiquant que si les cellules touchent la partie supérieure ou la partie gauche du cadre, elles sont comptabilisées mais si elles touchent la partie inférieure et droite, elles ne le sont pas.

Si la concentration cellulaire est très élevée, il est facile de se perdre dans le comptage, il est utilisé un ordre de comptage en forme de zigzag.

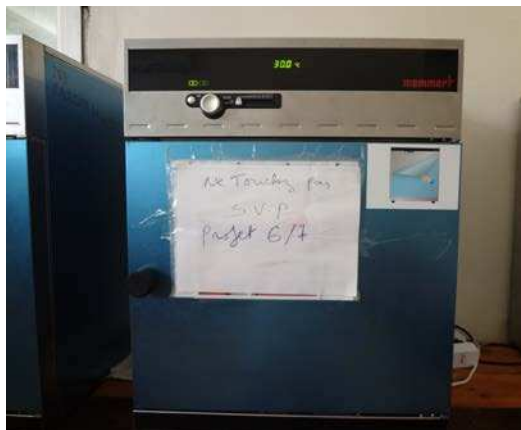
Calculs du nombre de cellules :

$$\text{Nombre de cellules} = \frac{C_1 + C_2 + C_3 + \dots + C_{25}}{25} \times 10^5 \text{cellules/ml}$$

C : carrées de comptage (25 carrées).

ANNEXE 05:

**Autoclave****Balance****Bain marie****Centrifugeuse**

**Etuve****Lyophilisateur****Microscope optique****PH-mètre**



Rotavapeur



Spectrophotomètre UV - VIS