

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



**Mémoire pour l'obtention du diplôme de
Master en sciences de la mer**

Sujet :

**Essai de culture de six microalgues
marines utilisées en aquaculture.**

Présenté par :

➤ OURZIK Mokrane

Soutenu le 13/10/2012 devant le jury suivant :

M ^{me} AMROUCHE. L	Maitre assistante	ENSSMAL	Présidente
M ^f BELHASNAT. K	Maitre de conférences	ENSSMAL	Examineur
M ^f LOURGUIOUI. H	Maitre assistant	ENSSMAL	Examineur
M ^f ZOUAKH. D	Maitre de conférence	ENSSMAL	promoteur
M ^{elle} MERBAH.S	Attachée de recherche	CNRDPA	Co-Promotrice

Promotion 2011 / 2012

Remerciements

Je tien à présenté mon immense gratitude à MERBAH.S. Et Mr ZOUAKH.D., pour m'avoir fait confiance et donné les moyens de mener à terme ce travail.

Je tien à remercier tous les membres du CNRDPA en particulier Fatima et Amina qui m'ont aidé durant mon stage pratique.

Je remercie également chaleureusement Mme AMROUCHE. L d'avoir accepté de présider le jury, malgré ces innombrables obligations.

Un grand merci à Mr BELHASNET. K d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tien à remercier vivement Mr LOURGUIOUI.H, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

J'exprime ma gratitude à l'ensemble d'enseignants et mes amis qui ont si soigneusement partagé leurs connaissances en sciences de la mer, passion, qui nous a tous réuni à l'ENSSMAL.

Je tiens à remercier mes chers parents et famille qui m'ont constamment aidé de leurs conseils, encouragements, et de leur soutien moral tout le long de mes études.

Sommaire

Introduction	1
Chapitre I : Les généralités	
1.Généralités sur les algues.....	3
2.Utilisation des microalgues en éclosérie de mollusques.....	3
2.1.Contraintes d'utilisation des algues fourrage	4
2.1.1.La taille	4
2.1.2. La valeur nutritive	5
2.1.3. La facilité de production.....	6
3.Présentation des espèces étudiées	6
3.1. Systématique et morphologie.....	6
3.1.1. <i>Tetraselmis suecica</i>	6
3.1.2. <i>Pavlova lutheri</i>	7
3.1.3. <i>Nannochloropsis oculata</i>	8
3.1.4. <i>Dunaliella tertiolecta</i>	9
3.1.5. <i>Chaetoceros calcitrans</i>	10
3.1.6. <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	11
3.2. Écologie générale.....	12
3.2.1. Répartition géographique	12
3.2.2. Lumière.....	12
3.2.3. Température.....	12
3.2.4. Sels nutritifs.....	13
3.3. Biologie.....	13
3.3.1. Reproduction	13
3.3.2. Photosynthèse :	13
4. Culture des microalgues.....	14
4.1. Techniques d'isolement des souches.....	14
4.1.1. Isolement en milieu liquide	14
4.1.2. Isolement sur milieu solide.....	14
4.1.3. Isolement par dilution.....	14
4.2.Les condition physico-chimie de la culture des microalgues	15
4.2.1. Les condition physique.....	15
4.2.2. Condition chimique de culture	16

Sommaire

4.3. Les cultures souches et mères	17
4.3.1. Cultures souches	17
4.3.2. Culture mère	17
4.4. Cultures à échelle intermédiaire	18
4.4.1. Les cultures en batch	18
4.4.2. La méthode semi-continue	18
5. Croissance de microalgue	19
5.1. La phase de latence	19
5.2. La phase de croissance exponentielle	19
5.3. La phase stationnaire	20
5.4. Une phase de mortalité cellulaire.....	20
6. Contrôle du développement algal	20
6.1. Méthodes directes	20
6.2. Méthodes indirectes	21

Chapitre II : Culture des microalgues

I. Matérielles et méthodes	22
1. Souches des microalgues utilisées	22
2. Les conditions de culture utilisées	22
2.1. Lumière et Température.....	22
2.2. Eau de mer- eau douce.....	23
2.3. Asepsie.....	23
2.3. Aération et PH	23
3. Préparation de milieu de culture	24
4. Traitement de l'eau	25
5. Méthodes de cultures des micros algues.....	26
5.1. L'entretien des souches.....	27
5.2. Procédures pour la gestion des cultures souches	27
5.3. Méthode d'inoculation et repiquage	28

Sommaire

6. Suivi de densités des cultures	29
6.1. Le comptage et le suivi de la croissance des cellules algales	29
7. Estimation de taille des cellules.....	30
II. Résultats	31
1. Suivi de la culture de <i>Tetraselmis suecica</i>	31
2. Suivi de la Culture de <i>Pavlova lutheri</i>	33
3. Suivi de la culture <i>Nannochloropsis oculata</i>	35
4. Suivi de la culture <i>Dunaliella tertiolecta</i>	37
5. Suivi de la culture <i>Chaetoceros calcitrans</i>	39
6. Suivi de la culture de <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	41
III. Discussion	44
Conclusion	46
Références bibliographiques	47
Les annexes	

Liste des figures et des tableaux

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Morphologie de <i>Tetraselmis suecica</i> (Butcher1959) (Source : FAO .org).....	7
Figure 2 : Morphologie <i>Pavlova lutheri</i> (Emmanuèle P et al.; 2006).	8
Figure 3 : Morphologie <i>Nannochloropsis oculata</i> (http//www. greenwaterfarms.com).	8
Figure 4 : Morphologie de <i>Dunaliella tertiolecta</i> (Nedelec.M, 2009)	9
Figure 5 : Morphologie <i>Chaetoceros calcitrans</i> (Robert R, et al., 2004).....	10
Figure 6 : Morphologie de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (Bohlin, 1897).....	11
Figure 7 : croissance des microalgues en batch : source (www.aquoa.net).....	19
Figure 8 : Les souches de microalgues cultivées.....	22
Figure 9 : constituant de milieu de culture F/2 modifié.....	25
Figure 10 : Processus de culture algale montrant les différents intrants nécessaires. Le besoin ou non d'un traitement secondaire d'eau de mer, dépend de l'état de filtration initiale de l'eau (Helm et al, 2006).	26
Figure 11 : Étapes d'inoculation et repiquage de <i>Tetraselmis suecica</i>	28
Figure 12 : Photo du logiciel "Tsview" version 6.1.3.9.....	30
Figure 13 : <i>Tétrasselmis suecica</i> (X100).....	31
Figure 14 : Croissance de <i>Tetraselmis suecica</i> dans le milieu F/2 Provasoli modifié en fonction de temps exprimée en Log_2 (nombre de cellule/ml)	33
Figure 15 : <i>pavlova lutheri</i> (X100).....	33
Figure 16 : croissance de <i>Pavlova lutheri</i> dans le milieu F/2 provasoli modifié en fonction de temps exprimée en Log_2 (nombre de cellule/ml).....	35
Figure 17 : <i>Nannochloropsis oculata</i> (X100).....	35
Figure 18 : croissance de <i>Nannochloropsis oculata</i> dans le milieu F/2 provasoli modifié en fonction de temps exprimée en Log_2 (nombre de cellule/ml).	37
Figure 19 : <i>Dunaliella tertiolecta</i> (X100).....	38
Figure 20 : variation de concentration de <i>Dunaliella tertiolecta</i> dans le milieu F/2 Provasoli modifié en fonction de temps exprimée en (nombre de cellule/ml. 10^{-3}).....	39

Liste des figures et des tableaux

Figure 21 : <i>Chaetoceros calcitrans</i> (x40).....	39
Figure 22 : Croissance de <i>Chaetoceros calcitrans</i> dans le milieu F/2 Provasoli modifié en fonction de temps exprimée en (nombre de cellule/ml. 10^{-3})	41
Figure 23 : <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (X40).	41
Figure 24 : croissance de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> dans le milieu F/2 provasoli modifié exprimée en Log_2 (nombre de cellule/ml).....	43

Liste des figures et des tableaux

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Utilisation des algues-fourrage en éclosion de mollusques (a, b in Chrétiennot-Dinet et al., 1986) in (Robert & Trintignac 1997).....	4
Tableau 2 : Volume cellulaire, poids organique et composition en lipides des espèces d'algues étudiées (Helme et al., 2006).....	12
Tableau 3 : variation de la concentration cellulaire de <i>Tetraselmis suecica</i> exprimée en nombre de cellule/ml, et en Log_2 (nombre de cellule/ml) en fonction de temps dans le milieu F/2 Provasoli.....	31
Tableau 4 : variation de la concentration cellulaire de <i>Pavlova lutheri</i> exprimée en nombre de cellule/ml, et en Log_2 (nombre de cellule/ml) en fonction de temps dans le milieu F/2 provasoli modifié.....	34
Tableau 5 : variation de la concentration cellulaire de <i>Nannochloropsis oculata</i> exprimée en nombre de cellule/ml, et en Log_2 (nombre de cellule/ml) en fonction de temps dans le milieu F/2 provasoli modifié.....	36
Tableau 6 : variation de la concentration cellulaire de <i>Dunaliella tertiolecta</i> exprimée en nombre de cellule/ml. 10^{-3} en fonction de temps dans le milieu F/2 Provasoli modifié.....	38
Tableau 7 : variation de la concentration cellulaire de <i>Chaetoceros calcitrans</i> exprimée en nombre de cellule/ml. 10^{-3} , et en Log_2 (nombre de cellule/ml) en fonction de temps dans le milieu F/2 Provasoli.....	39
Tableau 8 : variation de la concentration cellulaire de <i>Phaeodactylum tricornerutum</i> exprimée en nombre de cellule/ml, et en Log_2 (nombre de cellule/ml) en fonction de temps dans le milieu F/2 Provasoli.....	41

Introduction

Introduction

L'aquaculture se fixe pour objectif de multiplier une espèce puis d'améliorer la survie et la croissance en agissant sur les conditions d'élevage. Cela conduit à considérer avec un soin tout particulier la nourriture et l'environnement des sujets élevés. Les problèmes posés par la production de nourriture phytoplanctonique en volumes compatibles avec les besoins d'une écloserie industrielle de mollusques bivalves et l'élevage simultané de plusieurs millions de naissains obtenus après métamorphose des larves.

Les algues unicellulaires isolées du plancton marin et mises en culture contrôlée ont constitué la nourriture de base la plus courante pour alimenter les jeunes stades de bivalves marins élevés en écloserie (Epifanio, 1981, Webb et Chu, 1981, Chretienotdinet et *al*, 1986 *in* Devauchelle, 1990), et ce depuis les essais fructueux de Cole en 1937 pour nourrir des larves d'huitres. En utilisant ces mêmes algues unicellulaires pour nourrir les proies vivantes (rotifères, artémias) distribuées aux larves de poissons, leur intérêt pour l'aquaculture s'est considérablement élargi (Le Borgne, 1986 *in* Devauchelle, 1990).

Les espèces de flagellés et de diatomées sont des microalgues qui constituent la base de la chaîne alimentaire marine. Le besoin de cultiver les microalgues s'est imposé puisque les concentrations phytoplanctoniques naturellement contenues dans l'eau de mer utilisée en écloserie sont insuffisantes pour assurer une croissance optimale des larves et juvéniles élevés à forte densité (Helm et *al*, 2006). Par ailleurs la qualité nutritive de l'algue varie avec sa taille, sa digestibilité (Pierson, 1983), l'âge de la culture, les formes (mobile, immobile) de l'algue et bien entendu la composition du milieu d'élevage (Parsons et *al*, 1961, Laing, 1985, Wikfors, 1986, Utting, 1985 *in* Devauchelle, 1990). Constituant tout ou une partie importante de la nourriture des animaux marins produits en écloserie, de nombreux travaux se sont développés pour chercher l'espèce ou la souche la mieux adaptée à un élevage en tenant compte de l'espèce et du stade élevés. Aujourd'hui l'ensemble de ces travaux a permis de mettre en exergue le caractère hypervariable des cultures d'algues : hypervariable dans les productivités, dans les formes (mobile, immobiles) obtenues en culture, dans les compositions biochimiques (Delaunay et *al*, 1990 *in* Devauchelle, 1990).

Introduction

L'objectif principal de ce travail est de maîtriser la culture de phytoplancton utilisé comme nourriture dans des écloseries des bivalves. Une première partie résume des informations sur la systématique, morphologie, culture des microalgues ; la seconde résume les méthodes et le matériel utilisés ; la troisième partie synthétise et interprète puis discute les résultats obtenus. La quatrième et dernière partie illustre les conclusions tirées.

Chapitre I :

Les généralités

1.Généralités sur les algues

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

2.Utilisation des microalgues en éclosion des mollusques

Les microalgues unicellulaires marines sont cultivées en éclosion pour servir de nourriture aux coquillages d'intérêt commercial à différents stades de développement. Jusqu'à récemment, ces algues ont constitué la seule source de nourriture pour les larves et les juvéniles des bivalves. La production des algues vivantes restera encore une composante très importante dans le bon fonctionnement d'une éclosion (Helm et al., 2006).

L'importance des productions phytoplanctoniques pour les éclosions de mollusques a été largement démontrée (Coutteau et Sorgeloos, 1992 ; Robert et Trintignac, 1997), Les quantités produites sont importantes, jusqu'à 100 m³/jour dans certaines éclosions commerciales (Donaldson, 1991) et la qualité reste cruciale essentiellement en phase larvaire (Robert, et al. 2004).

Aujourd'hui, l'apport de microalgues, isolées du plancton marin et mises en culture contrôlée, constitue l'aliment le plus courant pour les bivalves en élevage à tous les stades de développement. (Muller-Feuga, 1997). Le tableau suivant présente la fréquence d'utilisation de quelques espèces en éclosion de mollusques.

Tableau 1 : Utilisation des algues-fourrage en éclosérie de mollusques (a, b in Chrétiennot-Dinet et *al*, 1986) in (Robert et Trintignac 1997).

Algues-Fourrage	Fréquence d'utilisation (%)		
	(Walne, 1979) a	(Lucas, 1980) b	(Coutteau et Sorgelos, 1992)
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	40	37,5	37
<i>Dunaliella sp.</i>	0	25	9
<i>Nannochloropsis oculata</i>	0	25	*
<i>Pavlova lutheri</i>	70	62,5	26
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	50	12,5	5
<i>Tetraselmis suecica</i>	60	25	35

2.2. Contraintes d'utilisation des algues fourrage

Une première synthèse des travaux relatifs à l'utilisation d'algues unicellulaires pour l'alimentation des larves et des juvéniles de bivalves met en évidence un décalage important entre le nombre d'algues testées, environ une cinquantaine, et le nombre restreint d'espèces, environ une dizaine, effectivement utilisé en éclosérie de production (Chrétien notdinet et *al*, 1986). La taille, la valeur nutritive et la facilité de production en masse sont les trois facteurs retenus pour alimenter les jeunes stades chez les bivalves.

2.2.1. La taille

La taille représente un caractère incontournable. Cette taille doit être compatible avec celle de la larve ou du juvénile à nourrir. Les larves de bivalves sont des microphages dont la plus grande dimension varie le plus souvent entre 60 μm et 350 μm (Pontual et *al*, 1996). Le faible diamètre de leurs bouche et œsophage empêche l'ingestion de particules de plus de 10 μm pour les jeunes stades (larves \leq 130 μm de longueur moyenne) et de 30 μm pour les stades plus âgés (Riisgard et *al*, 1980; Fritz et *al*, 1984 ; Baldwin et Newell, 1991). Néanmoins, les microalgues ont des formes très différentes, souvent asymétriques. Elles sont régulièrement pourvues d'organes ou d'éléments annexes (flagelles, soies, coccolithes ...) rendant leur ingestion plus difficile (Robert et Trintignac 1997).

2.2.2. La valeur nutritive

Selon Robert et Trintignac (1997), elle dépend à la fois de la digestibilité et de la qualité biochimique de l'algue. De plus, elle est fortement dépendante des besoins énergétiques de chaque espèce de bivalve.

En ce qui concerne la digestibilité il a été montré que certaines algues comme *Chlorella autotrophica*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Nannochloris atomus* et *Stichococcus bacillaris* étaient ingérées par des larves de mollusques mais non digérées (Babinchack et Ukeles, 1979 ; Epifanio et Epifanio et al, 1981). Deux hypothèses sont avancées, La première concerne la nature et/ ou l'épaisseur de la "paroi" bien que la plupart des algues n'ont pas de véritables parois. L'absence de matériel enzymatique approprié durant les premiers stades larvaires tel que les cellulases, explique la non digestion des "parois" (Babinchak et Ukeles, 1979). La deuxième hypothèse concerne la production de métabolites toxiques par certaines algues en particulier les Chlorophycées (Davis et Guillard, 1958).

En ce qui concerne la qualité biochimique des microalgues, de nombreux auteurs ont montré que la quantité totale de glucides, de protéines ou de lipides n'explique pas les différences de valeur nutritionnelle (Brown et al, 1989).

Il est très difficile de comparer des données biochimiques dans la littérature. De plus, une confusion existe au niveau des souches dites différenciées géographiquement. Ainsi six souches d'*Isochrysis* sont actuellement utilisées sans que l'on soit réellement sûre de leur filiation (Wikfors et Patterson, 1994).

Les Mytilidés, comme *Mytilus edulis*, et les Vénéridés, comme *Tapes philippinarum* ou *Mercenaria mercenaria* sont plus tolérantes et donc susceptibles de se développer à partir d'un nombre plus important d'organismes phytoplanctoniques (Loosanoff et Davis, 1963; Robert, données non publiés). Trois critères peuvent être avancés pour expliquer cette notion de tolérance. Le premier est la taille de la larve à sa formation. Le deuxième critère est la notion de réserve de la larve à sa formation. Le troisième critère est la demande énergétique de la larve qui est différente selon l'espèce considérée.

2.2.3. La facilité de production

Les caractéristiques physiques de la culture tiennent une place prépondérante en éclosion commerciale où les productions phytoplanctoniques peuvent atteindre 20 m³ par jour (Robert, 1994). L'utilisation d'*Isochrysis (T-iso)* comme algue-fourrage à la place d'*Isochrysis galbana* pourtant plus nutritive (Helm et Laing, 1987) est due à sa plus grande facilité de production notamment pour des températures supérieures à 20 °C. En zone tropicale, *Chaetoceros gracilis* est prisée car elle est bien adaptée aux fortes températures y compris en culture extérieure (Robert et Trintignac, 1997).

3. Présentation des specs études

3.1. Systématique et morphologie

3.1.1. *Tetraselmis suecica*

Systématique : (source : www.zipcodezoo.com)

Embranchement :	Chlorophyta (A. Pascher, 1914)
Classe :	Prasinophyceae
Sous classe :	Chlorophycidae
Ordre :	Chlorodendrales (Fritsch, 1917)
Famille :	Chlorodendraceae (Oltmanns, 1904)
Genre :	Tetrasemis (S.F.N. Stein, 1878)
Espèce :	<i>Tetraselmis suecica</i> ((Kylin) Butcher)

Morphologie

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



Figure 1. Morphologie de *T. suecica* (Butcher, 1959) (Source : FAO .org).

3.1.2. *Pavlova lutheri*

Systematique (source : www.zipcodezoo.com)

Embranchement	:	Haptophyta
Classe	:	Pavlovophyceae
Ordre	:	Pavloales
Famille	:	Pavlovaceae
Genre	:	Pavlova
Espèce	:	<i>Pavlova lutheri</i>

Morphologie

Le genre *Pavlova* a longtemps été inclus dans la classe des Prymnésiophycées en raison de la présence d'un haptonème. L'absence d'écailles organiques sur le corps cellulaire est un des caractères qui les différencient à l'heure actuelle. Les travaux de biologie moléculaire ont permis de montrer que les caractéristiques des *Pavlova* justifiaient la création d'une nouvelle classe. L'espèce *P. lutheri* a été l'une des premières à être utilisée en aquaculture sous le nom de *Monochrysis lutheri* (Robert, et al, 2004).

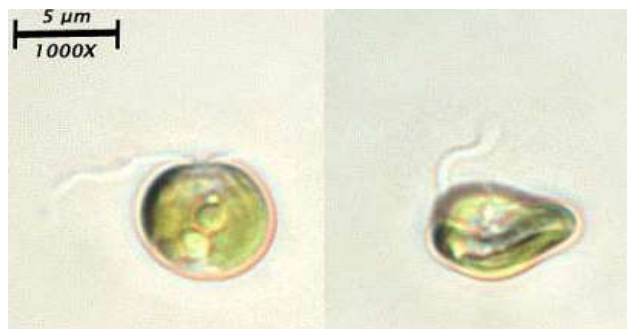


Figure 2 : Morphologie *Pavlova lutheri* (Emmanuèle et al, 2006).

3.1.3. *Nannochloropsis oculata*

Systématique (source : www.zipcodezoo.com)

Phylum	:	Ochrophyta
Classe	:	Eustigmatophyceae
Famille	:	Monodopsidaceae
Genre	:	<i>Nannochloropsis</i> (D.J. Hibberd, 1981)
Espèce	:	<i>Nannochloropsis oculata</i>

Morphologie :

La microalgue *Nannochloropsis oculata* est une cellule de couleur verdâtre, non mobile. Elle a une forme sphérique de 4-6 μm de diamètre. Le chloroplaste occupe habituellement une grande partie de la cellule. Les cellules tendent à flotter dans la culture et à rester en suspension sans aération (Hoff et Snell, 1987).

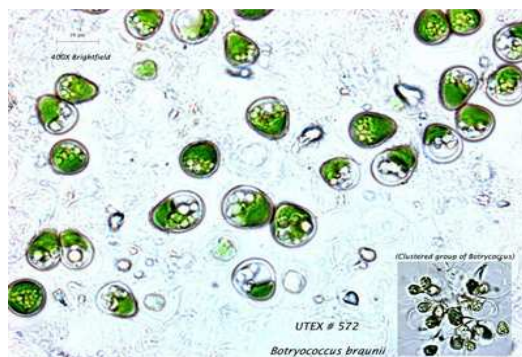


Figure 3: Morphologie *Nannochloropsis oculata* source (<http://www.greenwaterfarms.com>)

3.1.4. *Dunaliella tertiolecta*

Systématique (source : www.zipcodezoo.com)

Phylum	:	Chlorophyta (A.Pascher, 1914)
Classe	:	Chlorophyceae (Wille)
Ordre	:	Volvocales (Oltmanns, 1904)
Famille	:	Dunaliellaceae (T. Christensen, 1967)
Genre	:	<i>Dunaliella</i> (E.C. Teodoresco, 1904)
Espèce	:	<i>Dunaliella tertiolecta</i> (Bucher)

Morphologie :

Dunaliella tertiolecta appartient à la famille des chlorophycées (microalgue verte). De forme ovoïde, la cellule mesure de 8 à 10 μm . La concentration optimale est de 2 millions de cellules par millilitre. Elle sert essentiellement à la nutrition des larves d'oursins, des échinodermes. Sa grande taille n'est pas un obstacle pour l'alimentation des bivalves adultes mais est inadaptée aux larves de mollusques.



Figure 4 : Morphologie de *Dunaliella tertiolecta* (Nedelec, 2009)

3.1.5. *Chaetoceros calcitrans*

Systématique (source : www.zipcodezoo.com)

Phylum	:	Ochrophyta (Cavalier-Smith, 1986)
Subphylum	:	Diatomeae (Dumortier, 1821)
Classe	:	Coscinodiscophyceae
Ordre	:	Chaetocerotales
Famille	:	Chaetocerotaceae (Ralfs, in Pritchard, 1861)
Genre	:	Chaetoceros (C.G. Ehrenberg, 1844)
Espèce	:	<i>Chaetoceros calcitrans</i>

Morphologie

Les cellules sont carrées ou plus ou moins rectangulaires, de 5 à 10 µm selon l'allongement de la ceinture, les soies sont bien visibles et insérées de 15 à 35° par rapport à l'axe per-valvaire.



Figure 5 : Morphologie *Chaetoceros calcitrans* (Robert, et al, 2004).

3.1.6. *Phaeodactylum tricornutum*

Systematique (Lewin, 1958)

Embranchement	:	Chrysophyta
Classe	:	Bacillariophyceae
Ordre	:	Bacillariales (Hendey, 1937)
Famille	:	Phaeodactylaceae
Genre	:	Phaeodactylum (Bohlin, 1897)
Espèces	:	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>

Morphologie

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

Le frustule est composé d'une seule valve et il est peu silicifié. Cette microalgue est utilisée en conchyliculture pour la nourriture des moules, des huîtres ou des palourdes, notamment pour les stades juvéniles (Gagneux-Moreaux, 2006).

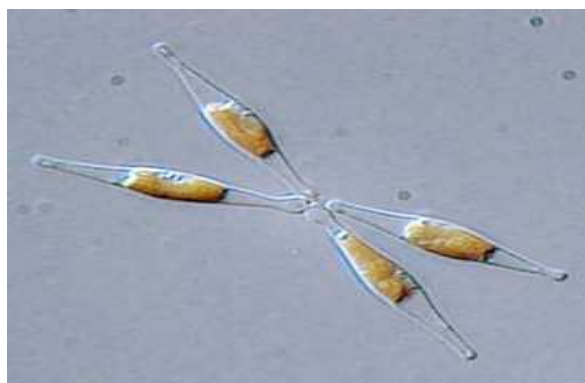


Figure 6 : Morphologie de *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin, 1897)

(Source : wikidoc.org)

Tableau 2 : Volume cellulaire, poids organique et composition en lipides des espèces d'algues étudiées (Helme et al, 2006).

Espèces		Volume cellulaire moyen (μm^3)	Poids organique ($\mu\text{g } 10^{-6}$ cellules)	Lipides %
Flagellés	<i>Tetraselmis suecica</i>	300	200	6
	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	170	85	21
	<i>Pavlova lutheri</i>	40-50	19-24	20-24
Diatomées	<i>Chaetoceros calcitrans</i>	35	7	17
	<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	40	23	12

3.2. Écologie générale

3.2.1. Répartition géographique

Les algues en général, ont toujours besoin d'eau, d'humidité, d'air, de lumière et de sels minéraux pour pouvoir se développer. Les micro-algues proprement dites ont presque une distribution universelle, dans les masses d'eau convenablement éclairées, qu'elles soient douces ou salées. (Davis, 1955).

3.2.2. Lumière

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

3.2.3. Température

La température est l'un des facteurs les plus importants qui conditionnent la répartition géographique des micro-algues (Gayral, 1975 in Hadjadji, 2002). La majorité des espèces qui vivent près des côtes tolèrent des variations de température saisonnières de grande amplitude et sont dites Eurythermes, par opposition aux espèces Sténotherme qui ne supportent qu'un faible échauffement ou refroidissement des eaux (Alzieu, 1986).

3.2.4. Sels nutritifs

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

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

3.3. Biologie

3.3.1. Reproduction

Il existe deux types de reproduction chez les micro-algues, reproduction sexuée et reproduction asexuée (Le borgne, 1985 *in* Barnabé, 1989) :

3.3.1.1. Reproduction asexuée

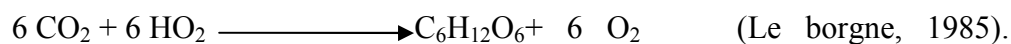
Les micro-algues se reproduisent soit par multiplication cellulaire chez les Cyanophycées et la mitose normale chez les Eucaryotes ; soit par la formation des cellules spécifique (Sporulation).

3.3.1.2. Reproduction sexuée

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

3.3.2. Photosynthèse :

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



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

4. Culture des microalgues

4.1. Techniques d'isolement des souches

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

4.1.1. Isolement en milieu liquide

Cette méthode convient principalement aux cellules assez grosses, ou en chaîne, de type *spiruline*, *skeletonema*. Les cellules doivent être diluées dans de l'eau de mer stérile et placées sous la loupe binoculaire. Elles sont ensuite prélevées une par une à l'aide d'une fine pipette pasteur et introduites dans un tube à essai contenant le milieu de culture. Une stérilisation de la souche sera effectuée ultérieurement par traitement antibiotique.

4.1.2. Isolement sur milieu solide

La technique est la même que celle pratiquée en bactériologie. On utilise des boîtes de pétri remplies de gélose et enrichies en milieu de culture (conway). On étale ensuite sur la gélose, à l'aide d'une anse de platine, une goutte contenant des cellules algales. Un premier développement apparaît. On prélève à nouveau quelques cellules qu'on étale sur une nouvelle boîte de pétri. L'opération peut-être reproduite plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'un développement d'algue monospécifique. Cette technique d'isolement est assez longue et laborieuse.

4.1.3. Isolement par dilution

Cette technique consiste à isoler les cellules par une succession de dilutions. C'est une méthode simple et rapide qui donne de bons résultats. La dilution peut être de l'ordre de $1/5^{\text{ème}}$ du volume à chaque étape. On utilise généralement des tubes à essai. En fin de dilution on doit obtenir une cellule par tube à essai.

4.2. Les conditions physico-chimiques de la culture des microalgues

4.2.1. Les conditions physiques

4.2.1.1. La lumière

L'intensité lumineuse joue un rôle important mais les besoins varient beaucoup avec le volume et la densité de la culture : plus le volume est important, plus la concentration cellulaire est élevée, et plus il faudra d'intensité lumineuse, car les premières couches de liquide empêcheront la pénétration en profondeur. On peut utiliser la lumière naturelle mais on devient alors très dépendant des variations climatiques. Pour aider à la pénétration de la lumière, il faut par ailleurs filtrer l'eau si elle est très turbide pour éliminer les particules en suspension (Barnabé, 1989).

4.2.1.2. La température

Les températures qui conviennent le mieux aux cultures de phytoplancton sont autour de 18-22 °C, en dessous les croissances des cultures sont ralenties, au-dessus les équilibres sont difficiles à maintenir et les cultures sont plus fragiles. Comme les éclairages fluorescents apportent de la chaleur, il est nécessaire de réfrigérer les cultures, surtout en petits volumes. On peut faire circuler de l'eau froide autour des récipients de culture ou plus simplement refroidir l'air de la pièce où ils se trouvent à l'aide d'un climatiseur (Barnabé, 1989).

4.2.1.3. Agitation

La plupart des cultures 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 L, tandis que pour les volumes plus importants, on utilise l'agitation par bullage d'air, qui a l'avantage d'apporter du gaz carbonique (Barnabé, 1989).

4.2.2. Conditions chimiques de culture

4.2.2.1. Stérilisation

Il convient d'éliminer les organismes présents dans l'eau de mer qui pourraient être en compétition avec les micro-algues. Il peut s'agir d'autres espèces de phytoplancton, de zooplancton phytophage ou simplement de bactéries (Barnabé, 1989).

4.2.2.2. Les sels minéraux

Les concentrations cellulaires des cultures de phytoplancton sont généralement beaucoup plus élevées que celles rencontrées dans le milieu naturel. Il faut, en contrepartie, leur fournir des sels nutritifs car ceux qui sont présents dans l'eau de mer ne suffisent plus. C'est ainsi qu'on ajoute du nitrate, du phosphate, et de silicate de sodium, ce dernier sel servant pour les diatomées uniquement. Des métaux-traces sont ajoutés en faible quantité également, ainsi que des vitamines (Barnabé, 1989).

4.2.2.3. Le gaz carbonique

Pour des cultures très denses, le gaz carbonique apporté par l'aire du bullage ne suffit plus et il est souhaitable d'ajouter un appoint de gaz carbonique. Toutefois, suivant l'âge de la culture, le réglage du débit de gaz carbonique et parfois délicat et il y a un risque de production de métabolites toxiques par des cultures à très haut densité (Barnabé, 1989).

4.2.2.4. Salinité

La salinité est définie comme étant la teneur totale de l'eau en sels dissous, la salinité élevée dans la colonne d'eau est due à la présence du chlorure (Gayral, 1975). Chaque espèce est caractérisée par ces variations de la salinité maximale, minimale ou optimale, selon leur résistance à la variation de la salinité ; on distingue des algues Euryhalines qui résistent aux fortes variations de salinité et des algues Sténohalines résistant aux faibles variations (Le borgne, 1986 *in* Barnabé, 1989).

4.2.2.5. pH

Le pH de l'eau de mer est alcalin, généralement voisin de 8,2, il subit de faible variation limité par le pouvoir tampon des sels d'acide faible, carbonate et hydrogénocarbonate La majorité des espèces tolèrent des variations de pH comprises entre 6 et 9 (Barnabé, 1989).

4.3. Les cultures souches et mères

4.3.1. Cultures souches

Ce sont des algues monospécifiques utilisées pour fournir des cultures mères. Comme elles sont précieuses, ces cultures sont maintenues dans des milieux de culture spécifiques, (le milieu de culture d'Erdschreiber, le milieu F/2, des géloses d'agar enrichie en nutriment en tubes à essai inclinés) (Helm et *al*, 2006). Elles doivent être entretenues avec un grand soin, alors un effort constant doit être déployé pour minimiser le risque de contamination des souches et des cultures mères par des organismes compétiteurs, des procédures de stérilisation doivent être suivies pour éviter toute contamination, et un repiquage régulier permet de garder des cellules jeunes avec un fort potentiel de croissance (Ameur et Amara, 2011).

4.3.2. Culture mère

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

Préparation des cultures mères

Les inocula ont maintenant une couleur foncée indiquant la croissance des microalgues. Une première dilution d'un dixième aura lieu en versant les inocula dans des erlenmeyer de 500 ml qui contiennent 250 ml d'eau de mer enrichie (milieu de culture) et refermés ensuite avec le papier aluminium. Le nom des espèces, ainsi que la date du transfert, doivent être marqués sur les tubes au feutre indélébile. Les souches mère sont obtenues et gardées auprès des lampes fluorescentes dans la salle de culture à une température de 18 à 22°C. Avant d'être utilisées, les cultures mères sont maintenues selon des périodes variables. Dans le cas des diatomées qui ont un temps de division court, cette période est de 3 à 5 jours, alors que pour la majorité des flagellés, elle est de 7 à 14 jours (Helm et *al*, 2006). Quand les cultures mères sont prêtes elles sont transférées dans des conditions stériles, comme décrit antérieurement. Selon les espèces et la densité des cultures, 20 à 50 ml sont transférés dans 250 ml de culture fraîche pour le maintien de la lignée des cultures mères. Le reste est utilisé comme inoculum pour des cultures de plus grands volumes (jusqu'à 25 litres) (Ameur et Amara, 2011).

4.4. Cultures à échelle intermédiaire

Le but de culture est l'obtention de petits volumes d'algues destinés à la nourriture des larves. Deux types de culture peuvent être utilisés en «batch» ou semi-continu (Helm et *al*, 2006 in Ameer et Amara, 2011) :

4.4.1. Les cultures en batch

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

4.4.2. La méthode semi-continue

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

5. Croissance de microalgue

Les étapes de la croissance d'une culture en batch, sont identiques à celles des bactéries et on peut distinguer quatre phase essentielles (figure 7)

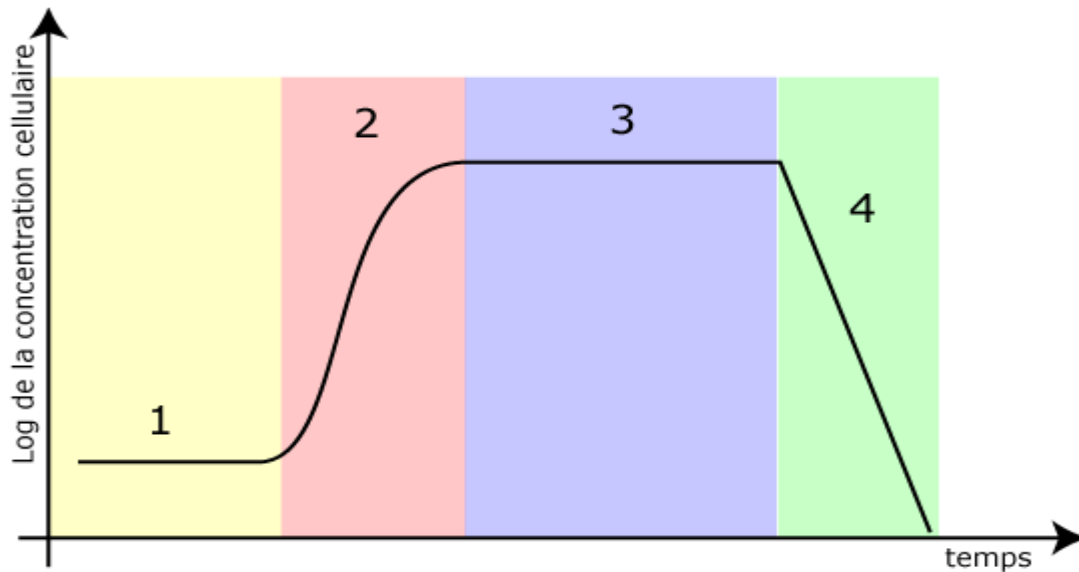


Figure 7 : croissance des microalgues en batch : source (www.aquoa.net)

5.1. La phase de latence :

Durant laquelle le nombre de cellules diminue ou reste stationnaire. Ceci est dû au fait que toutes les cellules inoculées ne sont pas viables et que les cellules viables ne sont pas en condition optimale pour se diviser. La phase de latence est d'autant plus longue que l'inoculum est âgé et que sa taille est petite. Cette phase est plus courte quand la culture est repiquée dans la première partie de la phase exponentielle (Spencer, 1954 *in* Hadjadji, 2002).

5.2. La phase de croissance exponentielle

Les cellules se divisent activement et utilisent tous les nutriments mis à leur disposition. Cette phase ne s'arrête que lorsque le facteur limitant a totalement été utilisé. C'est pendant cette phase que l'on utilise une culture (Guéret, 2004).

Selon Fiala, (1978) Le développement de la population est exprimé par un taux de croissance :

$$N_1 = N_0 \exp(K \cdot t)$$

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

N_1 : le nombre de cellule au temps t_1 .

N_0 : le nombre de cellule au temps t_0 .

K : la constante de croissance.

Avec : $t = t_1 - t_0$

5.3. La phase stationnaire

Une phase où le nombre de cellules ne varie pratiquement pas ; il peut y avoir une modification chimique du contenu cellulaire par suite du vieillissement. Cette phase peut durer plusieurs semaines s'il n'y a pas de contamination (Guéret, 2004)

5.4. Une phase de mortalité cellulaire

Pendant cette phase, les cellules ne se divisent plus et meurent, entraînant une dégradation de plus en plus importante des conditions de culture (pH). (Guéret, 2004). Selon Fernandez-Reiriz et *al*, (1989) Après un arrêt total des divisions cellulaires ; les cellules qui meurent ne sont pas remplacées.

6. Contrôle du développement algal

La croissance d'une culture est généralement exprimée comme étant l'augmentation d'une biomasse, d'un nombre de cellules ou d'un taux de chlorophylle par unité de temps (Bechagra et *al*, 1997). Il est utile, voire indispensable de contrôler régulièrement le développement algal afin de déterminer le stade ou l'état physiologique, ce qui revient à déterminer la quantité des microalgues. Pour cela, il existe plusieurs moyens d'évaluation quantitative des cellules dans la culture. Les méthodes d'évaluation de croissance peuvent être regroupées en :

6.1. Méthodes directes

- ✓ Par comptage ou numération au compteur de particules au microscope à l'aide d'une cellule de comptage.
- ✓ Par mesure de leur volume cellulaire après centrifugation. La mesure est facilitée si le fond des bols de centrifugation est long et étroit (Le Borgne, 1978 *in* Barnabé, 1986).
- ✓ Par le poids sec après centrifugation ou filtration d'un volume important, c'est précis pour comparer les cultures entre-elles (Fiala, 1979), mais le processus est long et ne permet pas un diagnostic rapide (Jaques, 1978).

6.2. Méthodes indirectes

✓ Par mesure de la densité optique (Do), soit par mesure de la turbidité par photométrie ou de la chlorophylle par une spectrophotométrie (Fiala, 1979) ; On peut établir une correspondance entre la densité optique et la concentration cellulaire ; une variation consiste à mesurer la teneur en chlorophylle (Neveux, in Jacques, 1978).

✓ Par mesure : des pigments, protéines, (ATP, Carbone, Azote, etc.....).

Il est souvent nécessaire de connaître les variations du nombre de cellules. Ces numérations nécessitent des cellules ou des chambres de comptage. Plusieurs types de celles-ci existent, chacune d'elles fournissant une précision optimale pour une taille de cellule et une concentration donnée (Fiala, 1978, Audineau et al, 1986). Le comptage s'effectue sous le microscope à l'aide d'une cellule de profondeur connue et dont le quadrillage défini dans un volume déterminé.

Chapitre II :
Culture des microalgues

I. Matériels et méthodes

1. Souches des microalgues utilisées

Les souches des espèces des microalgues utilisée dans cette étude, ont été obtenues dans le cadre d'un projet de coopération Algéro- Espagnol : les différentes espèces sont les flagellés *Pavlova lutheri* (Figure 8 : A), *Tetraselmis suecica* (Figure 8 : B), *Dunaliella tertiolecta* (Figure 8 : C), *Nannochloropsis oculata* (Figure 8 : D), et les diatomées *Chaetoceros calcitrans* (Figure 8 : E) et *Phaeodactylum tricornutum* (Figure 8 : F).

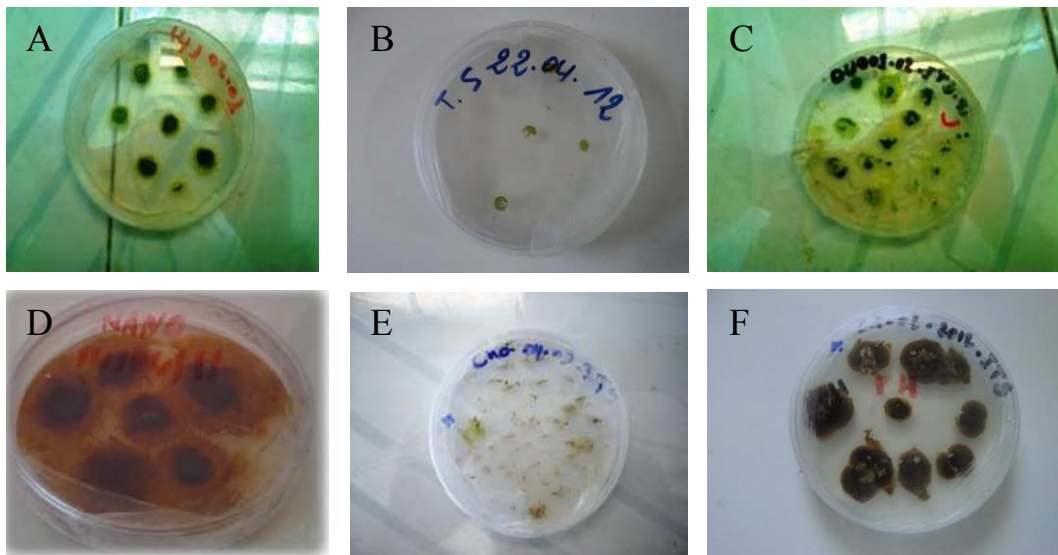


Figure 8 : Les souches de microalgues cultivées.

2. Les conditions de culture utilisées

2.1. Lumière et Température

Au niveau du CNRDPA, la culture des algues se fait dans une salle de culture de microalgues (annexe 04), disposant des étagères équipées à l'arrière par des lampes fluorescentes et en face par des lampadaires. Les cultures sont aérées en permanence à partir de pompes à air pour apporter la fraction de CO₂ nécessaire (sans enrichissement avec du CO₂ pur) et pour empêcher la sédimentation des algues et s'assurer que toutes les cellules de la population sont exposées à la lumière et aux éléments nutritifs. En l'absence d'aération, les algues sédimentent et les cultures peuvent s'effondrer (Helm et al, 2006).

La présente étude consiste à cultiver des microalgues dans des volumes de 4 litres et de 10 litres exposées à une source de lumière. Pour cela une intensité lumineuse préférentielle pour l'ensemble des espèces cultivées varie de 3.500 à 5.000 lux. Pour obtenir une production maximale l'énergie lumineuse est fournie 24 heures sur 24, Des tubes fluorescents de 40 et 60 watts, de type "blanc industrie" sont utilisées. Dans la salle de culture tous les flacons, les tubes à essai et les bouteilles contenant la culture algale sont placés à 15/20cm des néons disposés horizontalement ou verticalement contre le mur. Cette salle est maintenue à une température de 18-24°C, c'est la température moyenne qui correspond aux besoins des espèces phytoplanctoniques (Helm et al, 2006).

2.2. Eau de mer- eau douce

La méthode de culture proposée nécessite l'utilisation de l'eau de mer et de l'eau douce. L'eau douce est principalement utilisée pour l'ajustement de la salinité de l'eau de mer, qui devra être stérilisée avant l'utilisation. La salinité utilisée pour la culture est de 25‰ pour toutes les espèces sauf la diatomée *Chaetoceros calcitrans* qui nécessite une salinité à 20‰.

2.3. Asepsie

Il est important de travailler en conditions aseptiques pour obtenir une culture monospécifique de phytoplancton et éviter toute contamination, par des bactéries, du phytoplancton et des animaux qui vont consommer ce phytoplancton.

De plus, la garantie d'une culture monospécifique permet un contrôle rigoureux de l'alimentation des animaux élevés notamment lors du conditionnement pour la reproduction de certains bivalves.

2.4. Aération et pH

L'air apporte aux algues l'oxygène et le gaz carbonique et permet l'agitation du milieu pour le maintien des algues en suspension. Un apport en CO₂ est indispensable pour obtenir des concentrations importantes. Il permet d'une part le maintien du pH. (Mis en solution il va réagir avec l'eau pour donner de l'acide carbonique puis s'ioniser pour donner du bicarbonate qui stabilisera le pH). D'autre part il constitue une source de carbone pour les algues.

3. Préparation de milieu de culture

Le milieu de culture utilisé dans ce travail est le F/2 « manqué de la biotine (vitamine H) », les étapes de préparation sont décrites dans le tableau ci-dessous :

Solution I :

Nitrate de sodium (NaNO_3) 37,5 g

Qsp 500 ml d'eau déminéralisée

Solution II :

Di-hydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4) 2,5 g

Qsp 500 ml litres d'eau déminéralisée

Solution silicatée (pour les diatomées) :

Métasilicate de sodium ($\text{Na}_2\text{SiO}_3, 5\text{H}_2\text{O}$) 1,5 g

Qsp 500 ml d'eau déminéralisée

Solution métallique :

Composition pour 1 litre :

Chlorure de fer hexahydraté ($\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$) 3,15 g

Acide Ethylènediamine tetraacétique de sodium (Na_2EDTA) 4,36 g

Sulfate de cuivre pentahydraté ($\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$) 1 ml d'une solution à 9,8 g/L

Sulfate de zinc heptahydraté ($\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$) 1 ml d'une solution à 22 g/L

Chlorure de cobalt hexahydraté ($\text{CoSO}_4, 6\text{H}_2\text{O}$) 1 ml d'une solution à 10 g/L

Chlorure de manganèse tetrahydraté ($\text{MnCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$) 1 ml d'une solution à 180 g/L

Qsp 1 litre d'eau déminéralisée

Solution vitaminique :

Composition pour 10 litres :

2 g de Thiamine (Vitamine B1)

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

Qsp 10 litre d'eau déminéralisée stérilisée. « Solution à conserver au réfrigérateur ».

Utilisation :

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

Pour 1 litre d'eau de mer :

1 ml de solution I

1 ml de solution II

1 ml de solution métallique

0,5 ml de solution vitaminique

1 ml de solution silicatée pour les diatomées



Figure 9 : constituant de milieu de culture F/2 « manqué de la biotine (vitamine H) »

La stérilisation des flacons contenant les solutions I, II et métallique (Fig.14) se fait à l'autoclave. Cette étape permet de limiter l'entrée de contaminants pathogènes provenant du milieu extérieur (virus, procaryotes, protozoaires). (Delvil, 2009).

4. Traitement de l'eau

L'eau est prise en mer par des seaux, une première filtration est faite à l'aide d'un filtre en nylon de 45 μ m. La filtration définitive est assurée par des séries de papier filtre, éliminant successivement les particules d'une taille supérieure à 10 à 5 μ m. L'eau obtenue peut être utilisée brute ou après ajustement de la salinité, suivi d'une stérilisation à l'autoclave 120 °C pendant 20 minutes,.

5. Méthodes de cultures des micros algues

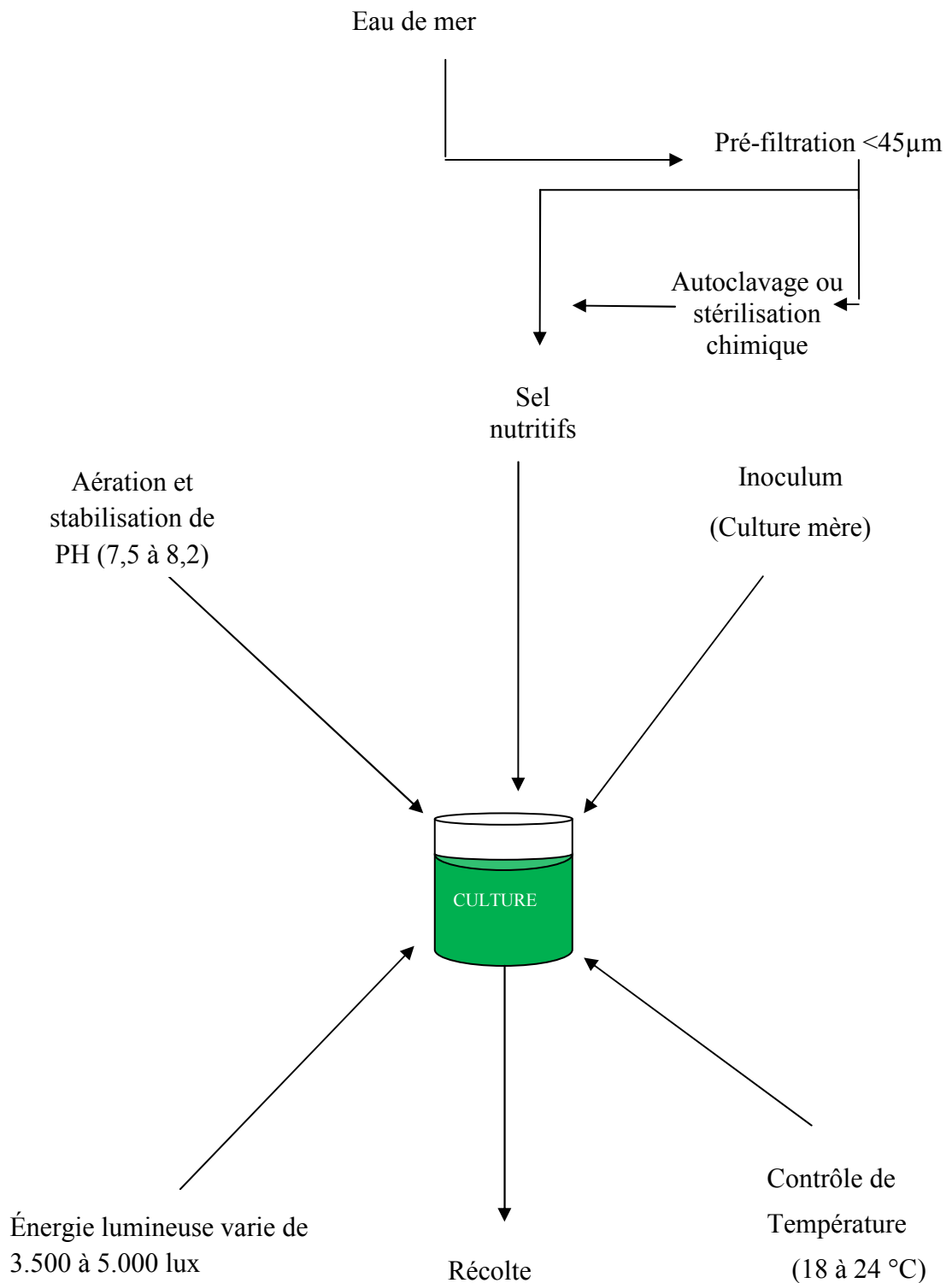


Figure 10 : Processus de culture algale montrant les différents intrants nécessaires. Le besoin ou non d'un traitement secondaire d'eau de mer, dépend de l'état de filtration initiale de l'eau (Helm et *al*, 2006).

Le mode de culture suivie est la culture en batch ; 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 pour une bonne croissance de la population phytoplanctonique. Il n'y a plus d'échanges d'éléments nutritifs, ni de biomasse avec l'extérieur : le milieu est clos, on peut également appeler une culture en batch une culture fermée (Herbland, 2007). Un schéma du processus de culture phytoplanctonique est présenté dans la (figure 10).

5.1. L'entretien des souches

Les souches doivent être repiquées tous les 07 à 14 jours afin de les maintenir en bonne condition. Cette durée entre chaque repiquage est idéale pour conserver des cellules jeunes avec un bon potentiel de multiplication. Le repiquage consiste à dédoubler une souche mère pour obtenir deux souches filles. Une souche fera au bout de 07 jours, office de souche mère. L'autre souche fille permettra une éventuelle mise en route d'une culture.

5.2. Procédures pour la gestion des cultures souches

Pour maintenir les souches dans un bon état de santé, il est nécessaire de les repiquer mensuellement. Après avoir enlevé le bouchon (coton) de l'erenmeyer ou du tube et passé à la flamme l'ouverture du tube au bec bunsen un inoculum de 20 à 50 ml est repiqué dans un autre erlenmeyer stérile contenant du milieu de culture autoclavé. Le bouchon en coton est remplacé après avoir passé à la flamme le goulot de l'erenmeyer. Le nom des espèces, ainsi que la date du transfert, doivent être marqués sur l'erenmeyer au feutre indélébile qui doit être remplacé par la suite dans l'incubateur. La souche originale peut être gardée pendant quelques semaines au cas où la nouvelle culture ne parviendrait pas à croître.

5.3. Méthode d'inoculation et repiquage

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

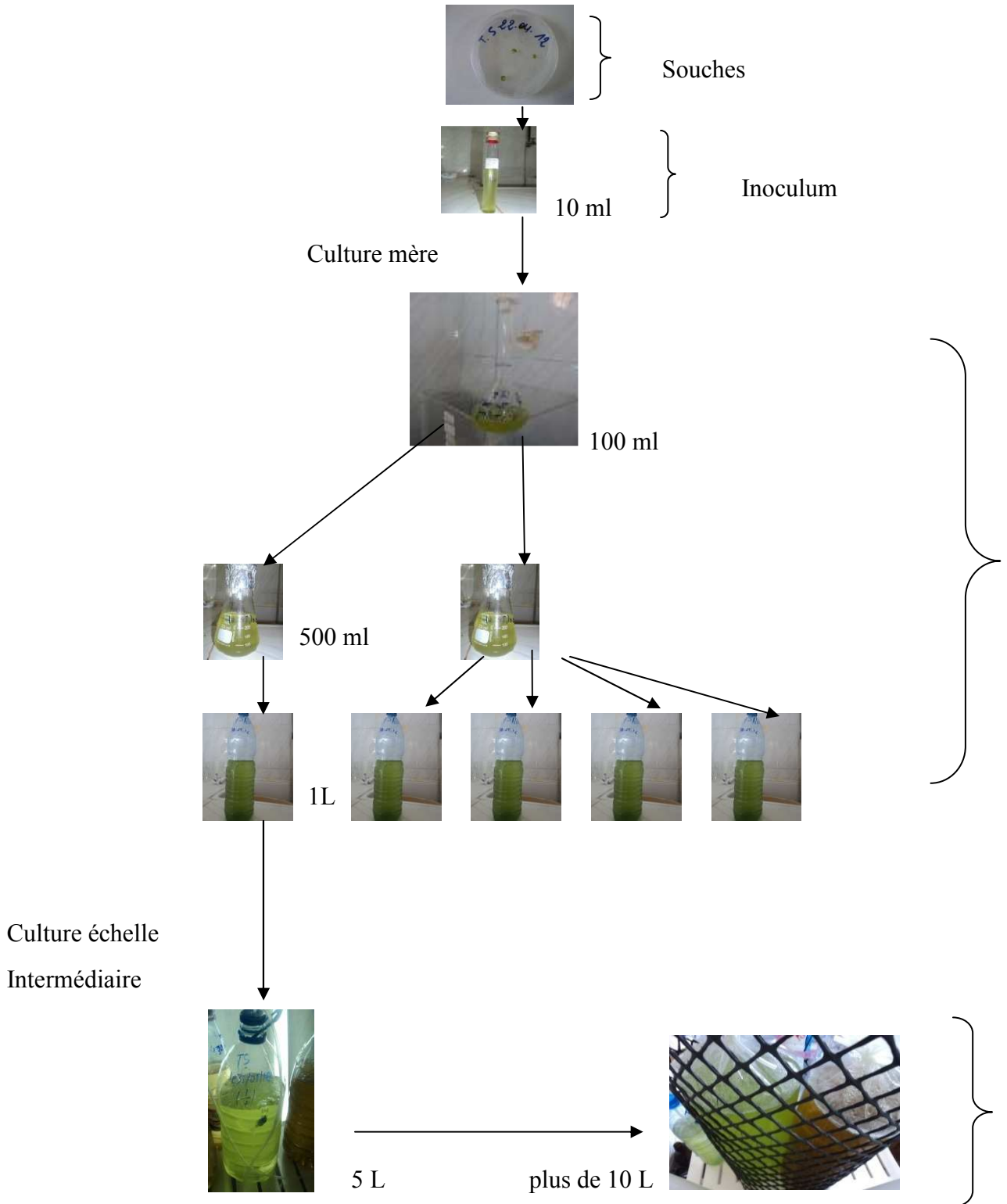


Figure 11 : Étapes d'inoculation et repiquage de *Tetraselmis suecica*.

6. Suivi de densités des cultures

Les micro-algues sont maintenues sur milieu F/2 de Provasoli en ballon de 3 litres sous une intensité lumineuse de 3500 lux, à une température varie entre 18 à 24°C. Selon Herbland (2007) en phase exponentielle, le taux journalier de division est égale a :

$$\mu = \ln (N_t/N_0) / \Delta t$$

Avec : \ln : le logarithme népérien, N_0 : la biomasse au temps t_0

N_t : la biomasse au temps $t > t_0$, Δt : l'intervalle de temps $t - t_0$

Le taux de croissance est souvent exprimé en nombre de doublements par unité de temps (k), plutôt qu'en T^{-1} . On passe de μ à k en divisant μ par le logarithme népérien de base 2 :

$$K = \mu / \ln (2) = \mu / 0,693$$

Où : N est la concentration cellulaire de la culture et t le temps (Guillard, 1973) *in* (Robert et His, 1987).

7. Le comptage et le suivi de la croissance des cellules algales

Dans ce travail, la cellule Malassez, un microscope optique (MOTIC.B1. Séries) et un compteur manuel (Annexe 2 ; figure : 1, 2, 3) ont été utilisés pour le comptage des cellules algales. Les différentes phases de la croissance ont été déterminées grâce à des comptages de cellules phytoplanctonique réguliers à l'aide d'une cellule de Malassez.

La cellule de comptage a une profondeur connue et un quadrillage défini qui donnent un volume déterminé (10^{-5} ml) (Annexe 2 ; figure : 4, 5, 6).

But : déterminer une concentration en cellules dans un ballon de culture de microalgues.

Technique de comptage.

L'agitation de la solution et obligatoirement avant de passé au microscope, Une première observation au microscope a été effectuée à l'objectif (10X) pour la mise au point des cadres, mais le comptage a été effectué a grossissement (40X). À l'aide d'un compteur, le nombre de cellule par case est déterminé ce dernier es converti en nombre moyen de cellules par unité de volume. Le détaille de technique est démontré en (annexe 2).

8. Estimation de taille des cellules

Pour estimer la taille des espèces étudiées, plusieurs photos (jusqu'à 100) ont été prises périodiquement pour être mesurées à l'aide du logiciel "Tsview" version 6.1.3.9. Une centaine de cellules ont été mesurées pour avoir une longueur moyenne, un intervalle de confiance et un écart type à partir de programme de « l'Excel » pour chaque espèce.

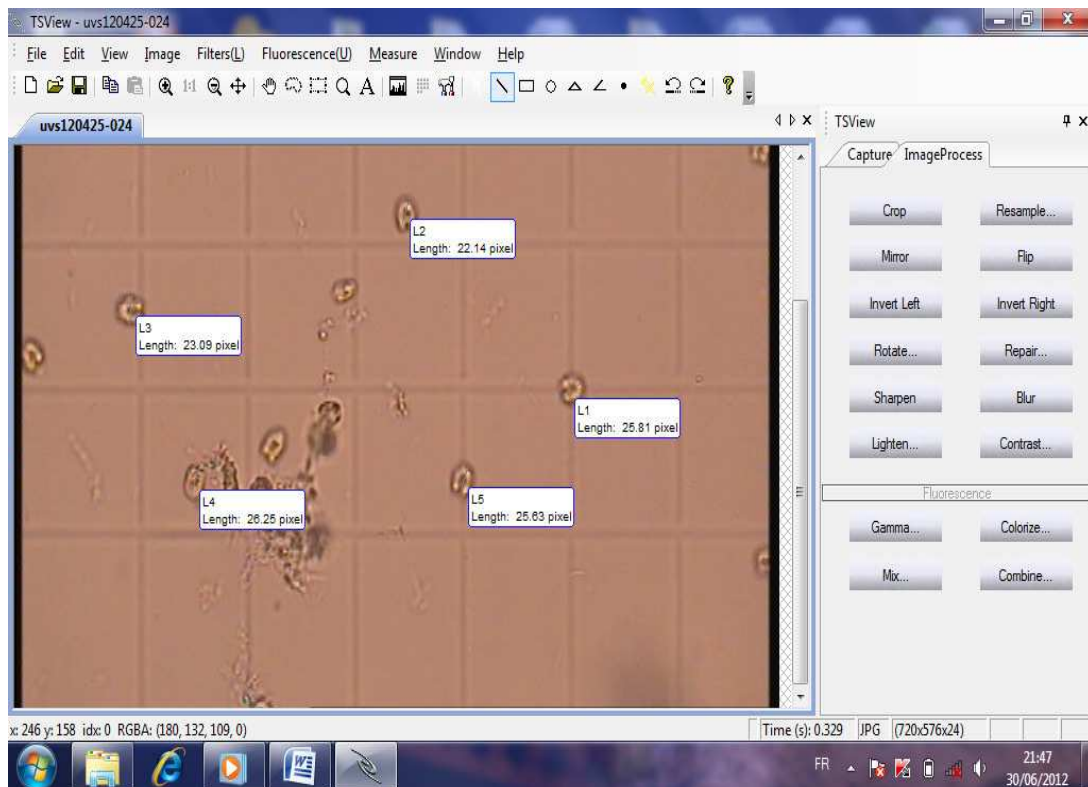


Figure 12 : Photo du logiciel "Tsview" version 6.1.3.9

II. Résultats**1. Suivi de la culture de *Tétraselmis suecica***

Les cellules de *Tétraselmis suecica* (figure 13) ont une forme plus ou moins ovale de longueur moyenne de $12,79\mu\text{m} \pm 0,34$, mesurées par le logiciel 'Tsview' (version 6.1.3.9).

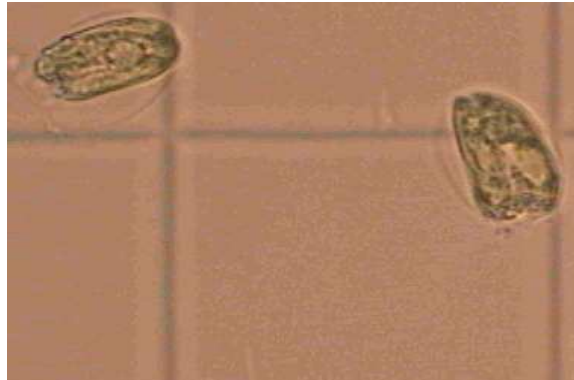


Figure 13 : *Tétraselmis suecica* (X100)

Production et croissance

Le volume produit durant 60 jours est estimé à 20 litres repartis sur différents volumes de cultures, variant de 500 ml jusqu'au plus grand volume de culture dans un sac de capacité de 25 litres.

Tableau 3 : variation de la concentration cellulaire de *Tetraselmis suecica* exprimée en nombre de cellule/ml, et en Log_2 (nombre de cellule/ml) en fonction de temps dans le milieu F/2 Provasoli.

N° de jours	Nombre de cellules/ml.10 ⁻³
1	120
2	150
3	200
4	330
5	420
6	430
7	600
8	700
9	800
10	1200
11	1200
12	1300
13	1200
14	1500
15	1700
16	1800
17	1880
18	1900
19	1900
20	2100
21	2100
22	2310
23	2050
24	1830
25	1600
26	1600
27	1600
28	2200
29	2800
30	2150
31	1850
32	1800
33	1700
34	1500
35	1300
36	1900
37	2200
38	1800
39	1000
40	800
41	470
42	230
43	150
44	100
45	10

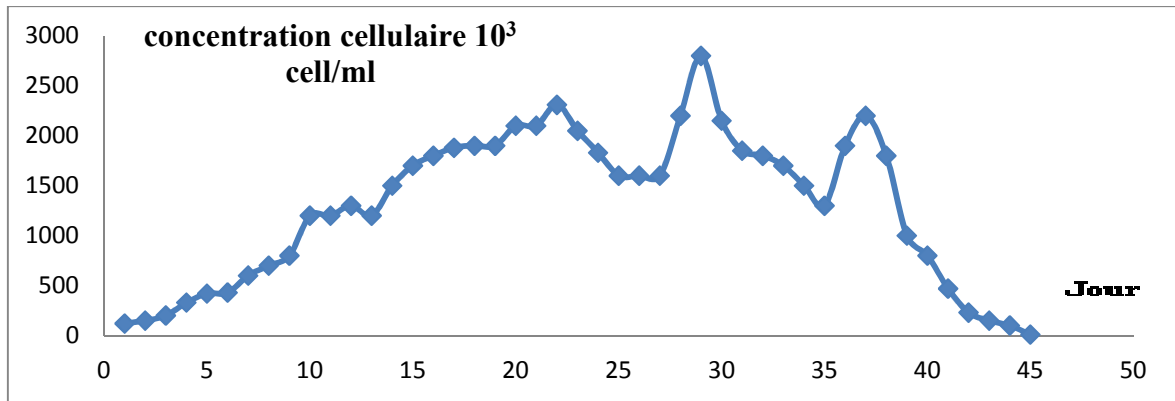


Figure 14 : Croissance de *Tetraselmis suecica* dans le milieu F/2 Provasoli modifié en fonction de temps exprimée en Log_2 (nombre de cellule/ml)

L'établissement de la courbe de croissance permet d'observer 3 des 4 phases de croissance d'une culture de *Tetraselmis suecica*. Le graphe (Figure 14), montre une phase exponentielle de 10 j et une phase stationnaire de 28 j. Le maximum de concentration atteint est de $2,8 \cdot 10^6$ cell/ml au 29^{ème} jour. A partir du 30^{ème} jour, la concentration diminue mais cette baisse n'est pas suffisamment franche pour l'assimiler à la phase de déclin. La phase exponentielle est durée 10 jours. La croissance passe de la concentration $0,12 \cdot 10^6$ à $1,2 \cdot 10^6$ cell./ml à la fin de cette phase. Le taux de croissance instantané exprimé en T^{-1} est égal à : $\mu = 0,23 \text{ J}^{-1}$ ou bien $k = 0,33$ exprimé en nombre de doublements par jour.

2. Suivi de la Culture de *Pavlova lutheri*

La quantité de *pavlova lutheri* est estimée à 12 litres pour une durée de 25 jours. La taille moyenne des cellules de *pavlova lutheri* (Figure 15) mesurées par le logiciel 'Tsview' (version 6.1.3.9), est de $3,46 \mu\text{m} \pm 1,3$.

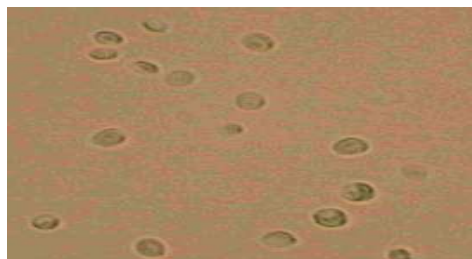


Figure 15 : *pavlova lutheri* (X100)

Tableau 4 : variation de la concentration cellulaire de *Pavlova lutheri* exprimée en nombre de cellule/ml, et en Log_2 (nombre de cellule/ml) en fonction de temps dans le milieu F/2 provasoli modifié

jour	Nombre cell/ml.10 ⁻³
01	2114
04	2864
06	3392
07	4364
08	4988
11	5300
12	6244
13	6615
14	7112
15	7880
16	8334
18	9400
19	9730
21	12248
22	12800
25	15840
27	16920

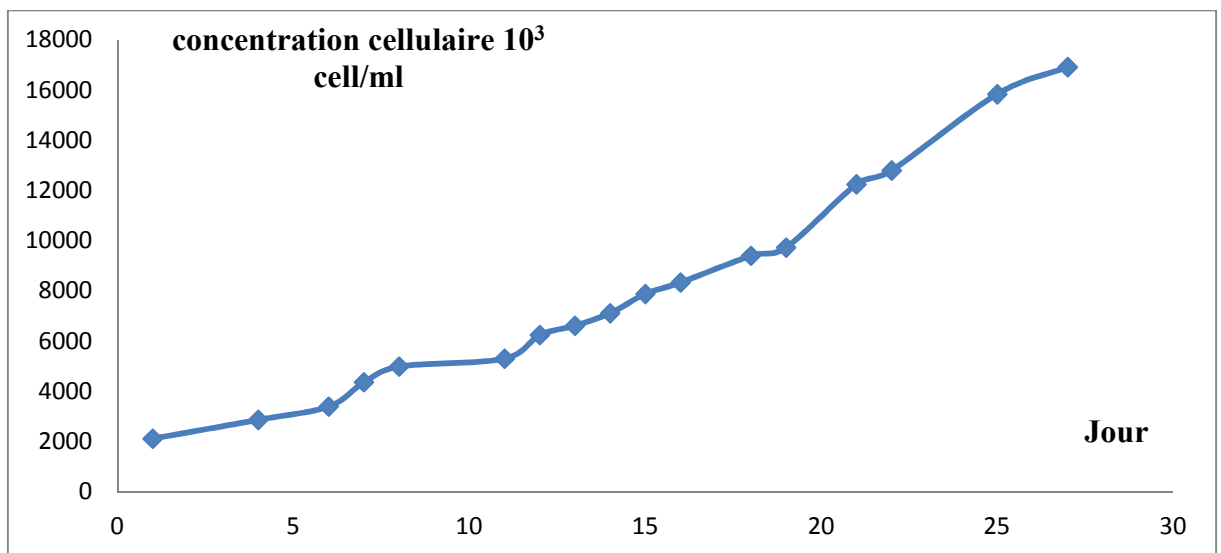


Figure 16 : croissance de *Pavlova lutheri* dans le milieu F/2 provasoli modifié en fonction de temps exprimée en Log_2 (nombre de cellule/ml).

L'établissement de la courbe de croissance permet d'observer 3 des 4 phases de croissance d'une culture de *Pavlova lutheri*. Le graphe (figure 16) montre une phase de croissance exponentielle durée 22 jours. Le maximum de concentration atteint est de $16,92 \cdot 10^6$ cell/ml au 27^{ème} jour. Le taux de croissance instantané exprimé en T^{-1} est égal à : $\mu = 0,21 J^{-1}$ ou bien $k = 0,30$ exprimé en nombre de doublements par jour.

3. Suivi de la culture *Nannochloropsis oculata*

Une bonne reproductibilité de *Nannochloropsis oculata* a été obtenue dans une période de 48 jours, soit un volume total de 50 l de *Nannochloropsis oculata* et une concentration maximale de $86 \cdot 10^6$ a été atteinte.

La taille moyenne des cellules de *Nannochloropsis oculata* (Figure 17) mesurées par le logiciel 'Tsview' (version 6.1.3.9), est de $4,23 \mu m \pm 1,22$.

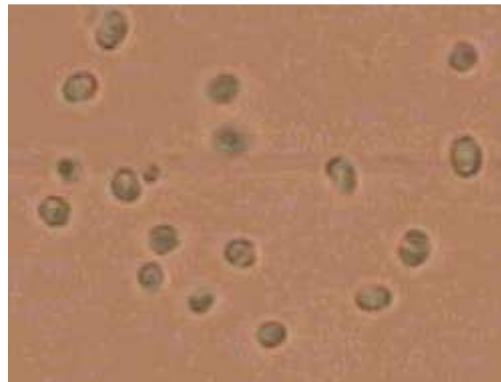


Figure 17 : *Nannochloropsis oculata* (X100).

Tableau 5 : variation de la concentration cellulaire de *Nannochloropsis oculata* exprimée en nombre de cellule/ml, et en Log₂ (nombre de cellule/ml) en fonction de temps dans le milieu F/2 provasoli modifié.

Jour	Nombre de cell/ml.10 ⁻³
1	1045
4	2072
5	2833
6	2900
7	3067
8	4000
11	7380
12	10550
13	13000
14	16900
15	21600
18	25800
19	28320
20	30240
21	32140
22	33700
25	42400
26	47800
27	51800
28	58700
29	59800
32	62000
33	63120
34	67200
35	73700
36	73800
37	79750
38	86000
40	79640
42	79000
43	80000
46	81240
47	80120
48	79000

L'évolution de la concentration algale au cours du temps permet de dresser la courbe de croissance (Figure 18)

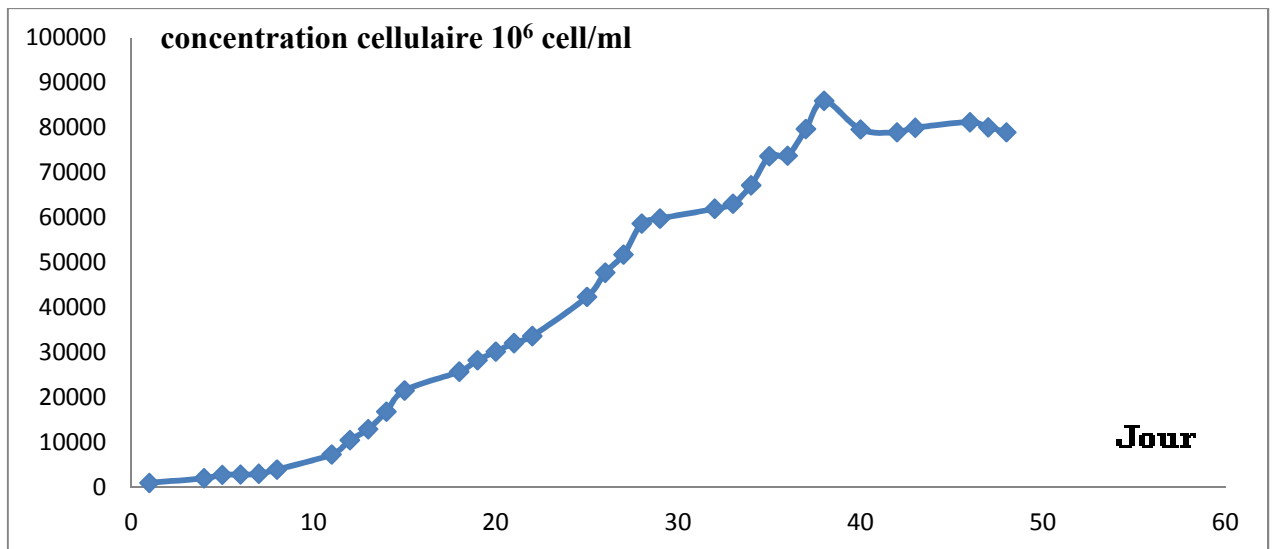


Figure 18 : croissance de *Nannochloropsis oculata* dans le milieu F/2 provasoli modifié en fonction de temps exprimée en Log_2 (nombre de cellule/ml).

L'établissement de la courbe de croissance permet d'observer 3 des 4 phases de croissance d'une culture de *Nannochloropsis oculata*. Le graphe montre une phase de latence de 8 jours (Figure 18), une phase exponentielle de 30 j et une phase stationnaire de 10 j. Le maximum de concentration atteint est de $86 \cdot 10^6$ cell/ml au 38^{ème} jour. A partir du 39^{ème} jour, la concentration diminue mais cette baisse n'est pas suffisamment franche pour l'assimiler à la phase de déclin. La phase exponentielle est la plus longue, 30 jours. La croissance passe de la concentration $4 \cdot 10^6$ à $86 \cdot 10^6$ cell./ml à la fin de cette phase. Le taux de croissance instantané exprimé en T^{-1} est égal à : $\mu = 0,1022 \text{ J}^{-1}$ ou bien $k = 0,1475$ exprimé en nombre de doublements par jour.

4. Suivi de la culture *Dunaliella tertiolecta*

La taille moyenne des cellules de *Dunaliella tertiolecta* (Figure 19) mesurées par le logiciel 'Tsview' (version 6.1.3.9), est de $9,67 \mu\text{m} \pm 0,45$.



Figure 19 : *Dunaliella tertiolecta* (X100)

Production et croissance

Le volume produit durant 60 jours est estimé à 45 litres repartis sur différents volumes de cultures, variant de 500 ml jusqu'au plus grand volume de culture dans un sac de capacité de 20 litres.

Tableau 6 : variation de la concentration cellulaire de *Dunaliella tertiolecta* exprimée en nombre de cellule/ml.10⁻³ en fonction de temps dans le milieu F/2 Provasoli modifié.

Jour	Nombre de cell/ml.10 ⁻³
1	200
4	500
5	600
6	1100
7	1200
10	1300
11	1400
12	1400
13	1400
14	1300
17	1200
18	1300
19	1300
20	1200

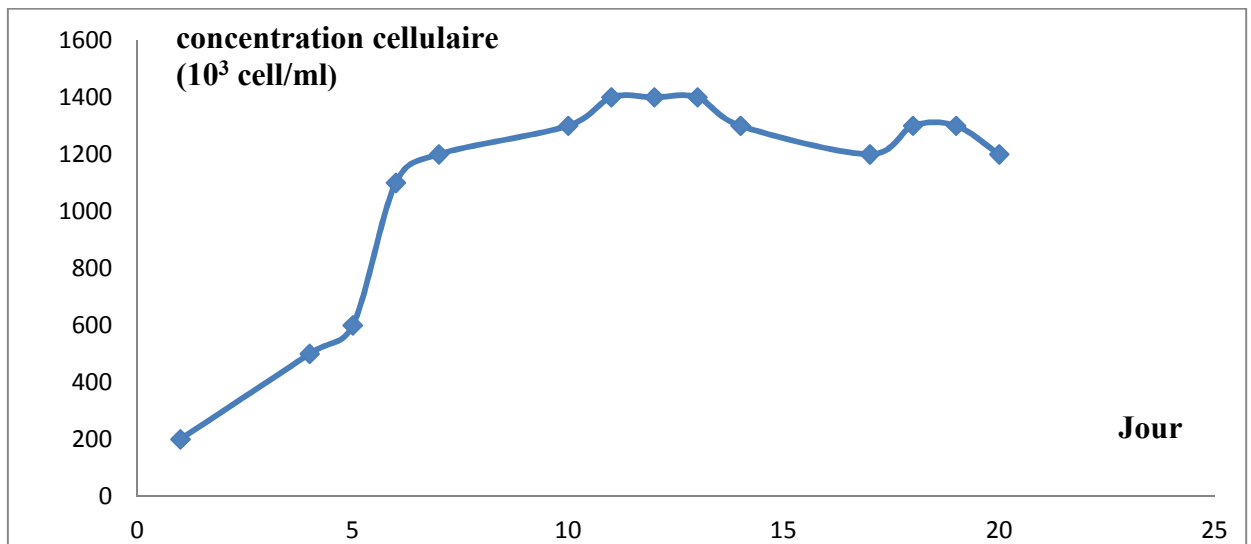


Figure 20 : variation de concentration de *Dunaliella tertiolecta* dans le milieu F/2 Provasoli modifié en fonction de temps exprimée en (nombre de cellule/ml. 10⁻³)

L'établissement de la courbe de croissance permet d'observer 3 des 4 phases de croissance d'une culture de *Dunaliella tertiolecta*. Le graphe montre (Figure 20), une phase exponentielle de 7 j et une phase stationnaire de 14 j. Le maximum de concentration atteint est de $1,4 \cdot 10^6$ cell/ml au 11^{ème} jour. A partir du 14^{ème} jour, la concentration diminue mais cette baisse n'est pas suffisamment franche pour l'assimiler à la phase de déclin. La phase exponentielle durée 7 jours, La croissance passe de la concentration $0,2 \cdot 10^6$ à $1,4 \cdot 10^6$ cell. /ml à la fin de cette phase. Le taux de croissance instantané exprimé en T^{-1} est égal à : $\mu = 0,278 J^{-1}$ ou bien $k = 0,401$ exprimé en nombre de doublements par jour.

5. Suivi de la culture *Chaetoceros calcitrans*

La taille moyenne des cellules de *Chaetoceros calcitrans* (Figure 21) mesurées par le logiciel 'Tsview' (version 6.1.3.9), est de $6,58 \mu m \pm 1,46$.

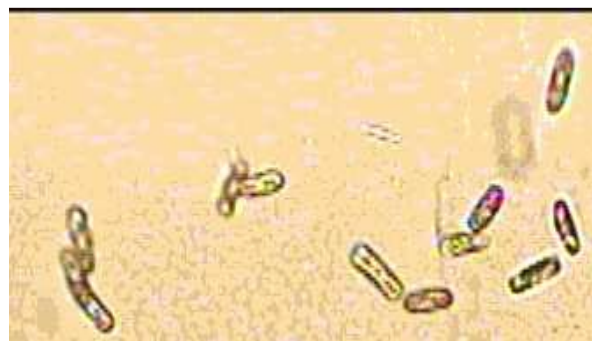


Figure 21 : *Chaetoceros calcitrans* (x40)

Production et croissance

Le volume produit durant 60 jours est estimé à 30 litres repartis sur différents volumes de cultures (250 ml, 500ml ,1L, 5L, 10L).

Tableau 7 : variation de la concentration cellulaire de *Chaetoceros calcitrans* exprimée en nombre de cellule/ml. 10^{-3} , et en Log_2 (nombre de cellule/ml) en fonction de temps dans le milieu F/2 Provasoli.

Jour	Nombre de cell/ml. 10^{-3}
1	500
2	1400
3	1900
7	2400
8	3000
9	3100
10	3000
11	3200
12	2800
13	2600
16	2400
17	2400
18	2500
19	2600
20	2700
23	2400

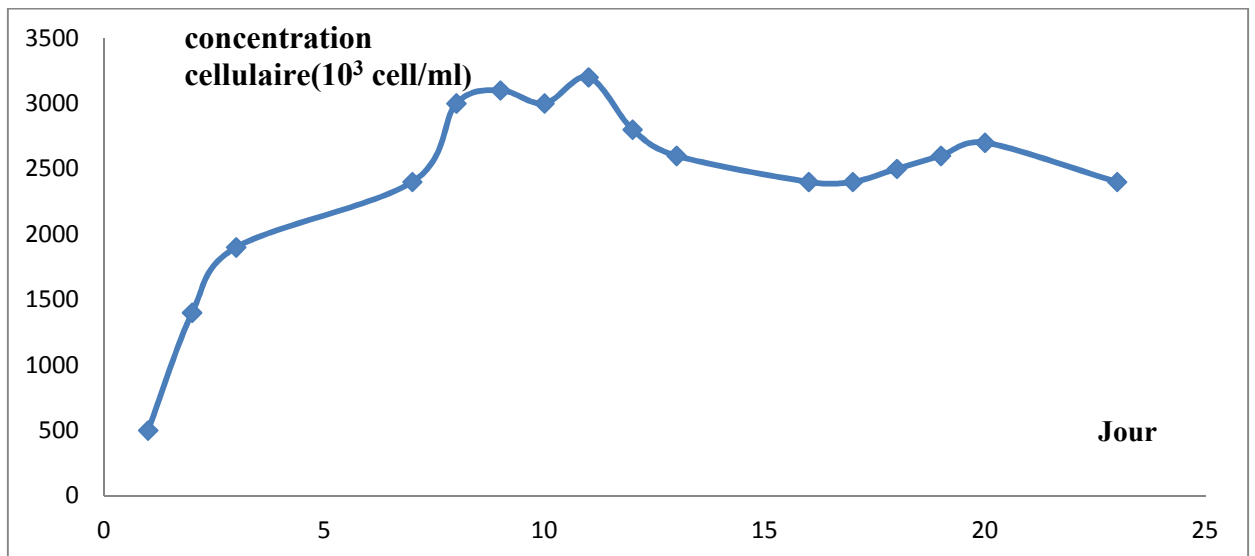


Figure 22 : Croissance de *Chaetoceros calcitrans* dans le milieu F/2 Provasoli modifié en fonction de temps exprimée en (nombre de cellule/ml. 10^{-3})

L'établissement de la courbe de croissance permet d'observer 3 des 4 phases de croissance d'une culture de *Chaetoceros calcitrans*. Le graphe (Figure 22), montre une phase exponentielle de 7 j et une phase stationnaire de 16 j et plus. Le maximum de concentration atteint est de $3,2 \cdot 10^6$ cell/ml au 11^{ème} jour.

La phase exponentielle est duré 7 jours. La croissance passe de la concentration $0,5 \cdot 10^6$ à $3 \cdot 10^6$ cell. /ml à la fin de cette phase. Le taux de croissance instantané exprimé en T^{-1} est égal à : $\mu = 0,255 J^{-1}$ ou bien $k = 0,37$ exprimé en nombre de doublements par jour.

6. Suivi de la culture de *Phaeodactylum tricornerutum*

Les cellules de *Phaeodactylum tricornerutum* (figure 23) sont fusiformes de longueur moyenne de $15,15 \mu m \pm 0,35$ mesurées par le logiciel 'Tsview' (version 6.1.3.9).

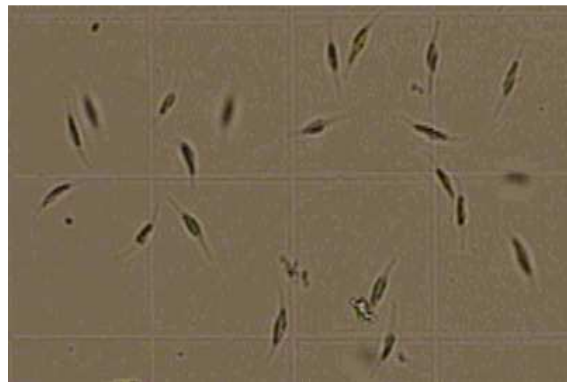


Figure 23 : *Phaeodactylum tricornerutum* (X40).

Production et croissance

La quantité de *Phaeodactylum tricornerutum* produite est de 30 litres pour une période de 60 jours, la couleur de la culture était brune foncée, mais elle a devenue claire dans une durée 3 jours.

Tableau 8 : variation de la concentration cellulaire de *Phaeodactylum tricornutum* exprimée en nombre de cellule/ml, et en Log₂ (nombre de cellule/ml) en fonction de temps dans le milieu F/2 Provasoli.

N° de jours	Nombre de cellules/ml.10 ⁻³
1	3560
2	4300
3	5200
4	6100
5	7000
6	8700
7	9500
8	11040
9	11500
10	12200
11	12800
12	9800
13	9700
16	8000
17	7800
18	7700
19	7600
20	6900
21	7000
22	6800
25	5500
26	5500
27	5800
28	7300
29	8500
31	9500
32	9600
33	9460
34	9100
35	8700
36	7800
37	8200
38	6200
39	4800
40	3330
41	2200
42	2000
43	1600
44	1200
45	900

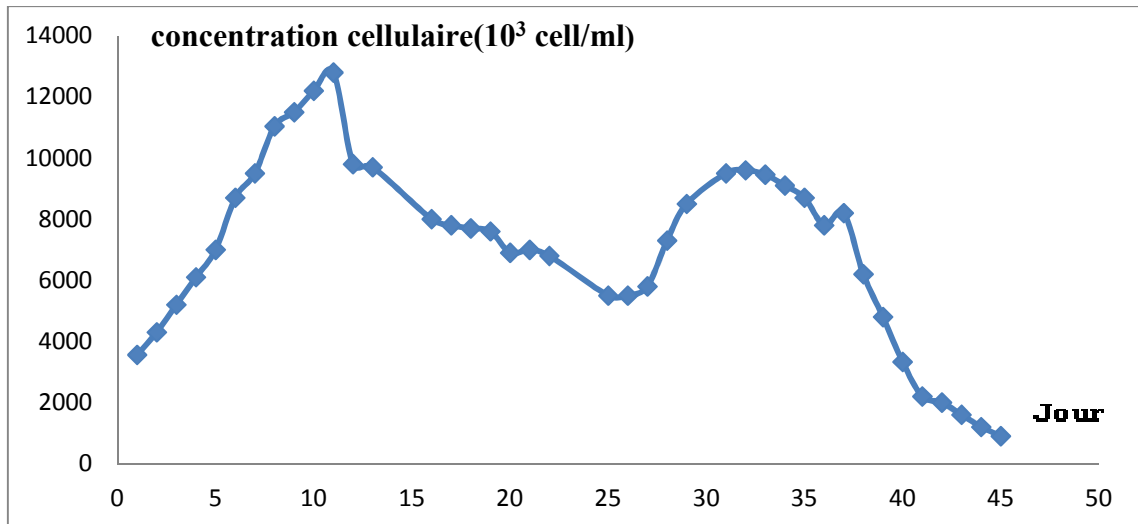


Figure 24 : croissance de *Phaeodactylum tricornutum* dans le milieu F/2 provasoli modifié exprimée en Log_2 (nombre de cellule/ml).

L'établissement de la courbe de croissance permet d'observer 3 des 4 phases de croissance d'une culture de *Phaeodactylum tricornutum*. Le graphe (Figure 24), montre une phase exponentielle de 10 j et une phase stationnaire de 22 j. Le maximum de concentration atteint est de $12,8 \cdot 10^6$ cell/ml au 11^{ème} jour. Puis une phase de chute de la concentration cellulaire est remarquée à partir du 33^{ème} jour. La phase exponentielle est duré 10 jours. La croissance passe de la concentration $3,56 \cdot 10^6$ à $12,8 \cdot 10^6$ cell. /ml à la fin de cette phase. Le taux de croissance instantané exprimé en T^{-1} est égal à : $\mu = 0,128 \text{ J}^{-1}$ ou bien $k = 0,185$ exprimé en nombre de doublements par jour.

III. Discussion

1. La culture de *Tetraselmis suecica*

La concentration cellulaire pour *Tetraselmis suecica* a atteint sa valeur maximale 29 jour après repiquage $2,8 \cdot 10^6$ cellule.mL⁻¹, cultivée en eau de mer naturelle et une salinité ajusté à 25 pour mille enrichie par le milieu F/2 « manqué de la biotine (vitamine H) », une valeur faible comparé au résultat obtenu par Azma et *al.*, (2010) où la concentration maximale obtenu est de 7,4 g/l dans le milieu de Walne « complet » et qui est deux fois supérieur au résultat obtenu. *Tetraselmis suecica* avec une densité cellulaire et un taux de division cellulaire ($\mu = 0,23$) obtenue dans ce travail, est très faible par rapport au résultat obtenue par Robert et *al.*, (1987) où ($\mu = 1,38$) avec une durée de phase exponentielle de 4 jours, cette différence peut être dû à le manque de milieu culture utiliser «la biotine vitamine H». Azma et *al.*, (2010) mentionnent que la croissance de *Tetraselmis suecica* est considérablement influencée par le type de milieu utilisé.

2. La Culture de *Pavlova lutheri*

Au cours de ce travail la phase exponentielle à duré plus de 22 jours pour atteindre une concentration de $128 \cdot 10^8$ cellule/l avec un taux de croissance de 0,21 g/L/jour confirmé par Ponis et *all* (2008) qui a obtenus une production journalière de 0,4 g/L/jour en culture semi continue. Robert et His (1987) ont signalé une phase exponentielle d'une durée de 12 jours avec un taux de division $K = 0,245$ pour *Pavlova lutheri* au système de culture en Bach le milieu utilisé est Conway. La légère différence peut être expliquée par l'enrichissement de l'eau de mer avec deux milieux différents.

3. La culture *Nannochloropsis oculata*

La culture de la microalgue *Nannochloropsis oculata* réalisée dans cette étude, a atteint une concentration maximale de $86 \cdot 10^6$ cell/ml et cela après 30 jours. Palanichamy et Rani (2004) ont trouvé une concentration de $85,8 \cdot 10^6$ cell/ml au bout de 34 jours, en utilisant le milieu de culture Walne, ceci est en accord avec les résultats obtenus. On peut dire que la biotine sans effet sur la croissance de *Nannochloropsis oculata*.

4. La culture *Dunaliella tertiolecta*

La concentration cellulaire pour *D. tertiolecta* a atteint sa valeur maximale 11 jour après repiquage $1,4 \cdot 10^6$ cellule. ml^{-1} , cultivée en eau de mer naturelle et une salinité ajustée à 25 pour mille enrichie par le milieu F/2 « manqué de la biotine (vitamine H) » à une température de 18-24°C. Une valeur faible comparée a celle obtenue par Nedelec (2009) où la concentration maximale est de $2 \cdot 10^6$ cellule. mL^{-1} . Le taux de croissance obtenu dans cette étude $\mu = 0,278 \text{ J}^{-1}$, est très faible par rapport a ce lui déclaré par Cadoret et Bernard (2008) où $\mu = 3.5 \text{ J}^{-1}$. Cette déférence peut être due à l'absence de la vitamine H dans le milieu de culture.

5. La culture *Chaetoceros calcitrans*

La concentration cellulaire pour *Chaetoceros calcitrans* a atteint sa valeur maximale 11 jour après repiquage $3,2 \cdot 10^3$ cellule. ml^{-1} , cultivée en eau de mer naturelle et une salinité ajustée à 20 pour mille enrichie par le milieu F/2 modifié à une température de 18-24°C. Une valeur faible comparée au résultat obtenu par Robert, et al, (2004) où la concentration maximale obtenu est de $28,5 \cdot 10^6$ cellule. mL^{-1} au 8^{ème} jour, cultivée dans le milieu de Conway à une température de 22-23°C et salinité de 28‰. La durée de la phase exponentielle et stationnaire obtenu dans ce travail sont semblable a celle trouvé par Robert et His (1987). Le taux de division cellulaire de *C. calcitrans* obtenue dans ce travail est légèrement supérieur par rapport au résultat obtenue par Robert.R Et His (1987) où ($K = 0,331$) dû à la différence des deux milieux de culture. Dans ce travail une chute de densité cellulaire a été observée le 11^{ème} jour durant la phase stationnaire à cause des conditions de culture (lumière température).

6. La culture de *Phaeodactylum tricornutum*

La culture de *Phaeodactylum tricornutum* a duré 60 jours, elle a atteint sa valeur maximale ($12,8 \times 10^6$ cellule. mL^{-1}) 11 jour après repiquage, une chute de densité cellulaire a été observée le 12^{ème} jour durant la phase stationnaire à cause des conditions de culture (surtout lumière et température). Des concentrations supérieures à $12,8 \cdot 10^6$ cellules. ml^{-1} sont obtenues en 11^{ème} jours de culture. Si ses performances de croissance sont intéressantes, cette souche est cependant assez fragile et exposée aux risques de contamination. Le taux de division de *P. tricornutum* obtenue dans ce travail est de ($K=0,185$) est plus petit dix fois comparé au taux de division obtenue par Robert et al (1989) ($k=1,54$).

Conclusion

Conclusion

La maîtrise des cultures d'algues 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. La bonne qualité des cultures phytoplanctonique est la principale condition pour la réussite de l'élevage d'organismes marins consommateurs de ces algues.

D'après les résultats obtenus, l'utilisation du milieu Provasoli F/2 « manqué de la biotine (vitamine H) » pour la culture des microalgues au cours de cette étude a permis d'avoir pour *Tétracelmis suecica*, *Dunaliella tertiolecta*, *Chaetoceros calcitrans* des densités de culture moyennement faibles en comparaison avec les trois autres espèces. Par contre, une bonne reproductibilité de *Nannochloropsis oculata* obtenue dans une période de 48 jours, soit un volume total de 50 l et une concentration maximale de $86 \cdot 10^6$ cell/ml a été atteinte. Pour *Phaeodactylum tricornutum* et *Pavlova lutheri* des densités de culture moyennes ont été obtenues, soit une densité maximale de $12,8 \cdot 10^6$ pour les deux espèces.

Les mesures effectuées sur la taille des espèces montrent que la flagellée *P. lutheri* et *N. oculata* possèdent des tailles petites ($3,46 \pm 1,3$; $4,23 \pm 1,22 \mu\text{m}$) et la même chose pour la diatomée *C. calcitrans* ($6,58 \pm 1,46 \mu\text{m}$), sont les plus favorisées pour les larves des bivalves par leurs tailles. Les trois autres espèces restantes possèdent des tailles plus grandes que les trois précédentes, il est préférable de l'utiliser pour nourrir les juvéniles et les géniteurs.

Différents paramètres du milieu qui régissent sur la croissance des microalgues, en éclosion des bivalves, restent à maîtriser, telle la maîtrise de la densité lumineuse, température et salinité optimale pour chaque espèce de microalgue. Aussi le milieu de culture le plus performant pour avoir une meilleure croissance de ces microalgues.

Enfin, il serait intéressant de reprendre ces travaux et de poursuivre ce travail afin de maîtriser la culture des microalgues et d'étudier la biochimie de ces espèces afin de déterminer la qualité nutritionnelle de chaque espèce diatomée ou flagellée.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Alzieu, C., 1986.** L'eau – milieu de culture in Barnabé, G., Aquaculture 1. P : 15-41.
- Ameur, Z et Amara, M., 2011.** Contribution à la maîtrise de l'élevage larvaire du mollusque bivalve *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). Mémoire d'ingénieur en science de la mer (spécialité aquaculture), ENSSMAL, 2011. P : 85.
- Audineau, P et Blancheton, G., 1986.** Production d'algues unicellulaires. Ifremer., Equipe Merea., station DEVA-SUD. P: 19.
- Azma, M Rosfarizan, M Raha, A et Arbakariya, B Ariff., 2010.** Culture and Adaptation to Heterotrophic Cultivation Improved Protocol for the Preparation of *Tetraselmis suecica* axenic .The Open Biotechnology Journal 4, P: 36-46.
- Barnabé., 1989.** Aquaculture volume 1. Lavoisier tec et Doc. P : 565.
- Bencherif, A et Racheff, H., 2011.** Quelques indices biologiques de *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819), Mollusque bivalve à potentialité mytilicole. Mémoire d'ingénieur en science de la mer (spécialité aquaculture), ENSSMAL, 2011. P : 95.
- Bougis, P., 1974.** Écologie de plancton marine tome 1. P : 196.
- Boulekraout et Zougar., 2006 .**culture de micro algue. Mémoire d'étude universitaire appliquée (D.E.U.A) en aquaculture I.S.M.A.L. P : 49.
- Bechagra, A., 1996.** La culture des microalgues. Mémoire DEUA. ISMAL. P : 42.
- Blancheton, A., 1985-86.** Production d'Algues unicellulaires. IFREMER. P : 19.
- Cadoretet, J-P et Bernard, O., 2008.** La production de biocarburant lipidique avec des microalgues : promesses et défis. Article paru dans le journal de la Société de Biologie, 202 (3), 201-211, P : 16.
- Davis, C.C., 1955.** The marine and fresh water. Michigan Station University Press. P : 53-68.
- Delvil, M., 2009.** L'oursin comestible *Paracentrotus lividus* : optimisation des conditions de production de larves et de juvéniles benthiques en éclosérie en vue d'opérations de réintroduction après état des lieux de la ressource sur plusieurs sites

Références bibliographiques

tests varois. Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme d'Agronomie Approfondie (DAA) ; Spécialisation Halieutique. P : 35.

Devauchelle, N., 1990. Génétique moléculaire et aquaculture : perspectives et exemple d'application sur les microalgues marines. DEA de Biologie cellulaire et moléculaire et Sciences de la santé Université de Rennes I et de Bretagne Occidentale. IFREMER BP70 29280–PLOUZANE. P: 48.

Emanuele P, Giuliana P, René R, Graziella C-Z, Francesco V, Mario R. T., 2006. Production and preservation of *pavlova Lutheri*. Influence of storage procedures on viability and on fatty acid composition. AQUA 2006. P : 17.

Fiala, M., 1978. Culture d'algues. IN : Phytoplancton : Biomasse, production, numération et culture. Ed du castillet. P : 77-97.

Fernandez, Rieriz, M.J Perez-Camacho, A Ferreiro, M.J Blanco, J Planas, M Campos, M.J. et Labrata, U., 1989. Biomasse production and variation in the biochemical profile (Total protein, Carbohydrates, RNA, Lipids, and Fatty Acids) of seven species of marine microalgue. Aquaculture. P: 17-37.

Gagneux et Moreaux., 2006. Les métaux (Cd, Cu, Pb et Zn) dans la production des microalgues sur différents milieux de culture : biodisponibilité, bioaccumulation et impact physiologique. Thèse de doctorat. Université de NANTES.

Gayral, P., 1975. Les algues, morphologie, cytologie, reproduction et écologie ; DOIN éditeur. P : 165.

Guéret, M., 2004. La culture en batch. <http://www.aquoa.net/spip.php?article13>.

Hadjadji, N., 2002. Essai de culture de l'espèce de microalgue *Chlorella* sp dans différents milieu de culture. Mémoire DEUA. ISMAL. P : 46.

Hoff et Snell., 1987. Plancton culture manuel, 5^{ème} édition. Publié par Florida AQ Farms, Inc. P : 147.

Helm, M et Bourne, N et Lovatelli, A., 2006. (comp. /éd.) Écloserie de bivalves. Un manuel pratique. FAO Document technique sur les pêches. No. 471. Rome, FAO. 2006. P : 184.

Références bibliographiques

Herbland, A., 2007. La culture du phytoplancton dans les bassins aquacoles Aspects théoriques et applications pratiques. Ifremer/DAC/RST. 2007- 04. P : 24.

Jacques, G., 1978. Phytoplancton ; biomasse, production, numération et culture Ed. Du castillet. P : 21-38.

Jorge, M.S Rocha., Juan, E.C Garcia., Marta, H.F Henriques., 2003. Growth aspects of the marine microalgue *Nannochloropsis gaditana*. Biomolecular Engineering 20 (2003). P: 237-242.

Lewin, J.C., 1958. The Taxonomic Position of *Phaeodactylum tricornutum*. J. gen. Microbiol. Woods Hole Oceanographic Institution, Woods Hole, Mass., U.S.A. P : 427-432.

Manguin, E et Viver, P., 1943. Les algues d'eau douce et leur intérêt en Pisciculture. Bull. Française de pisciculture, premier année n 192. P : 137-155.

Muller-Feuga, A., 1997. Microalgues enjeux de la recherche. IFREMER. P : 35.

Nedelec, M., 2009. La culture de Phytoplancton. Enseignement agricole formation grandeur nature, agro campus ouest, centre de Renne. P : 29.

Ponis, EG Parisi, G Chini Zittelli, F Lavista, R Robert et M.R Tredicic., 2008. *Pavlova lutheri* : Production, preservation and use as food for *Crassostrea gigas* larvae .Archimer. Volume 282 (1-4). P : 97-103.

Robert, R et al., 2004. Amélioration des productions phytoplanctoniques en éclosérie de mollusques : caractérisation des microalgues fourrage. Direction des Ressources Vivantes, Département des Ressources Aquacoles, Laboratoire de Physiologie des Invertébrés Marins, DRV/RST/RA/LPI/ 2004-05. P : 145.

Robert, R et His., 1987. Croissance et spectre de tailles de six algues Utilisées pour la nutrition de larves de bivalves En éclosérie, en culture non renouvelée. Quai du Commandant-Silhouette, 33120 Arcachon, France IFREMER. P : 09.

Robert, R et Trintignac, P., 1997. Microalgues et nutrition larvaire en éclosérie de mollusques. Société Française de Malacologie. Haliotis 26. P : 1-13.

Références bibliographiques

Rym Ben-Kheder, épouse Dhaoui ., 2007. Étude sur le développement larvaire de *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) en conditions contrôlées : recherche d'indices de qualité. Thèse docteur de l'université de Bretagne occidentale (ubo), Discipline : Océanologie Biologique. P : 241.

Les annexes

Les annexes

Annexe 01

Les différents milieux de cultures utilisés pour la culture des microalgues

(source : www.aquoa.net).

Milieu Walnes

Solution principale :

Composition pour 10 litres :

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

Qsp 10 litres d'eau déminéralisée

Solution métallique :

Composition pour 10 litres :

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

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

Seawater solution :

Composition pour 500 ml :

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

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

Les annexes

Utilisation :

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

Pour 1 litre d'eau de mer :

2 ml de solution principale

0,2 ml de solution vitaminique

2,5 ml de solution silicatée (cf milieu de Conway) pour les diatomées

Milieu Conway

Solution principale :

Composition pour 10 litres :

Nitrate de sodium (NaNO_3).....	1000 g
Di-hydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4).....	200 g
Acide Ethylènediamine tetraacétique de sodium (Na_2 EDTA).....	450 g
Acide borique (H_3BO_3).....	336 g
Chlorure de manganèse (MnCl_2).....	3,6 g
Chlorure ferrique (FeCl_3).....	13 g
Solution métallique.....	10 ml

Qsp 10 litres d'eau déminéralisée

Solution Métallique :

Composition pour 1 litre :

Chlorure de zinc (ZnCl_2).....	21 g
Chlorure de cobalt hexahydraté ($\text{CoCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$).....	20 g
Sulfate de cuivre pentahydraté ($\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$).....	20 g
Ammonium heptamolybdate tetrahydraté ($6(\text{NH}_4) \text{Mo}_7 \text{O}_{24}, 4\text{H}_2\text{O}$).....	09 g

Qsp 1 litre d'eau déminéralisée

Solution Vitaminique :

Composition pour 1 litre :

2 g de Thiamine (Vitamine B1)

0,1 g de cyanocobalamine (Vitamine B12)

Qsp 1 litre d'eau déminéralisée stérilisée

Solution à conserver au réfrigérateur

Les annexes

Solution Silicatée (pour les diatomées) :

Composition pour 1 litre :

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

Qsp 1 litre d'eau déminéralisée

Utilisation :

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

Pour 1 litre d'eau de mer :

1 ml de solution principale

0,1 ml de solution vitaminique

2,5 ml de solution silicatée pour les diatomées

Milieu F2 Provasoli

Solution I :

Nitrate de sodium (NaNO_3).....750 g

Qsp 10 litres d'eau déminéralisée

Solution II :

Di-hydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4).....50 g

Qsp 10 litres d'eau déminéralisée

Solution silicatée (pour les diatomées) :

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

Qsp 10 litres d'eau déminéralisée

Solution métallique:

Composition pour 10 litres :

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

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

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

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

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

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

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

Qsp 10 litres d'eau déminéralisée

Les annexes

Solution vitaminique :

Composition pour 10 litres :

2 g de Thiamine (Vitamine B1)

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

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

Qsp 10 litre d'eau déminéralisée stérilisée

Solution à conserver au réfrigérateur

Utilisation :

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

Pour 1 litre d'eau de mer :

1 ml de solution I

1 ml de solution II

1 ml de solution métallique

0,5 ml de solution vitaminique

1 ml de solution silicatée pour les diatomées

Annexe 02

Matériel utilisé dans les expériences :

- ✓ Eau de mer filtrée stérilisée et l'eau douce pour ajuster la salinité
- ✓ Une pompe à vide pour le pré filtration de l'eau
- ✓ Des filtres de 0,45µm
- ✓ Tubes à essais pour l'inoculation
- ✓ Des erlenmeyers de différents volumes (250 ml, 500 ml, 1L) et des bouteilles de 5 L pour les cultures intermédiaires.
- ✓ Des pipettes
- ✓ Autoclave pour la stérilisation de l'eau, et de matérielles
- ✓ Bec benzène pour assurer les conditions de stérilité
- ✓ Milieu de culture F/2
- ✓ Papier aluminium et para filme
- ✓ Des aérateurs pour apporter les gazes nécessaires aux cultures algales
- ✓ cellule malassez, pour le comptage journalier des micros algues
- ✓ Un microscope et un compteur manuel

Les annexes



Figure 1 : Cellule Malassez. **Figure 2** : Microscope optique. **Figure 3** : Compteur manuel

Description de la cellule malassez

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

Le volume d'une case est de:

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

Remplissage de la cellule malassez

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

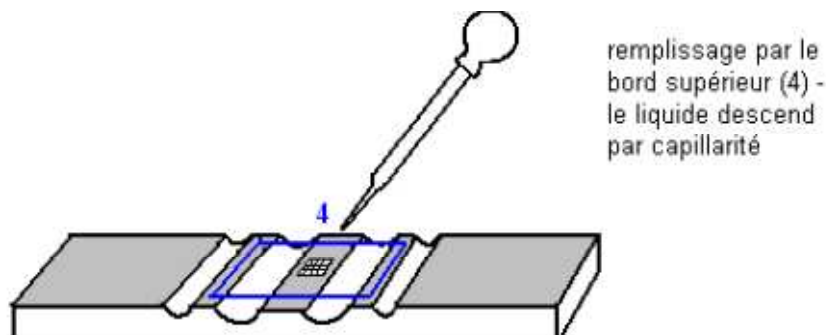


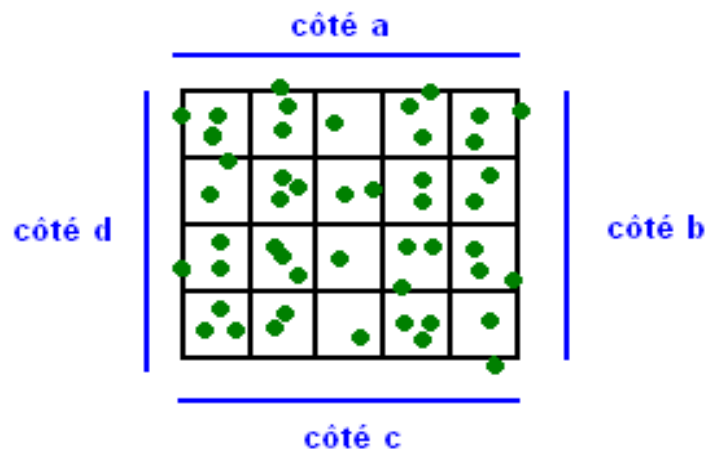
Figure 4 : technique de remplissage de la cellule malassez

Les annexes

Dénombrement :

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

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



Comment calculer le nombre moyen de cellules par case :

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

On a 45 cellules par 1 case

Soit : 45 cellules par 10^{-5} ml

5. Calculer la concentration cellulaire en cellules par ml :

45 cellules \longrightarrow 10^{-5} ml

[c] cellules \longrightarrow 1 ml

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

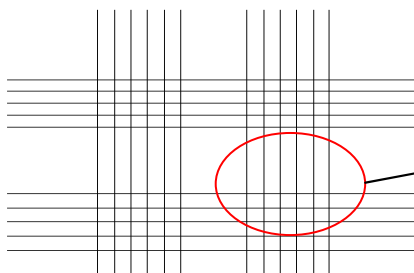


Figure 5 : quadrillage de la cellule de Malassez

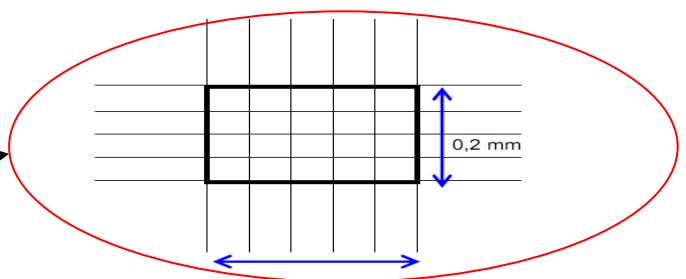


Figure 6 : Schéma d'une case

Les annexes

Annexe 03

Tableau 1 : caractéristiques des principales cellules de comptage (Blancheton, A, 1985)

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

Annexe 04



Figure 7 : Salle de culture des microalgues.

Les annexes

Annexe 05



Figure 8 : *Phaeodactylum tricornutum*



Figure 9 : *Chaetoceros calcitrans*



Figure 10 : *Tetraselmis suecica*



Figure 11 : *Dunaliella tertiolecta*



Figure 12 : *Nannochloropsis oculata*



Figure 13 : *pavlova lutheri*