

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 DE
MASTER EN SCIENCES DE LA MER**

OPTION : AQUACULTURE

Sujet :

**Comparaison de la valeur alimentaire de *Chlorella* et
Saccharomyces cerevisiae.**

Essais de nutrition d'Artémia.

Réalisé par :

M^{elle} KHERARBA Maha

Soutenu le 26-10-2013 devant le jury suivant :

Mr SEFIANE O.	Maitre-Conférence B (ENSSMAL)	Président
M^{me} DJEGHRI B.	Professeur (ENSSMAL)	Promotrice
M^{me} KORD A.	Attachée de recherche (CNRDPA)	Co- Promotrice
Mr BELHASNAT K.	Maitre-Conférence B (ENSSMAL)	Examineur
Mr BOUDJENAH M.	Attaché de recherche (CNRDPA)	Examineur

Promotion 2013

Dédicace

À du nom d'Allah le plus grand. Merci lui revient de m'avoir guidé vers le droit chemin et de m'avoir aidé tout au long de mes années d'étude.

Avec tout mon amour éternel et avec l'intensité de mes émotions. Je dédie ce mémoire :

À mon très cher père Kherareba Mahdi. Il est très difficile de choisir les termes adéquats pour t'exprimer mon amour et mon respect. Que Dieu te garde en bonne santé pour toute la famille.

À mon adorable mère Melzi Bouicha. Voudrais-je des profondeurs de mon amour et de ma reconnaissance te dédier ce mémoire, dont tous les mots que je pourrais utiliser seraient insuffisants pour te témoigner l'amour que je te porte.

Mes chers parents je n'oublie jamais vos sacrifices. Ce travail n'est que le fruit de votre soutien, de votre encouragement répété, de vos prières, de votre amour profond. Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur.

À mes chers et adorables frères Riadh, Eymen et le petit Badis. Je vous exprime à travers ce travail mes sentiments de fraternité et d'amour. Je vous souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité. Je vous aime énormément.

À mes chers grands parents. Que Dieu vous protège et vous laisse pour nous.

À toute ma famille tantes, oncles cousins et cousines, que ce soient maternelles ou paternelles.

Je ne saurai terminer sans citer mes amies Amira, Djamila, Lmen et Meriem, que je considère comme sœurs. Je vous remercie de votre patience, vous m'avez aidé toujours à avancer, merci d'être toujours près de moi, amies avec lesquelles je souris.

Remerciements

Avant de faire quelconque développements au sujet de cette expérience professionnelle, il apparait opportun de débiter ce mémoire par des remerciements aux personnes qui m'ont beaucoup aidé au cours de ce mémoire.

Tout d'abord, je remercie le CNRDPA de me donner l'opportunité de vivre une expérience aussi enrichissante tout sur le plan humain que professionnel.

Mes plus vifs remerciements à ma promotrice M^{me} B. Djeghri pour son encadrement, sa compréhension et sa gentillesse durant tout le long de mon mémoire.

Je tiens également à exprimer mes sincères gratitude à ma co-promotrice M^{me} Kord Affaf, ses conseils, ses orientations ainsi que son soutien moral et scientifique m'ont permet de mener à terme de ce projet. Je ne saurais jamais vous remercier assez.

Je remercie très sincèrement les membres de jury d'avoir bien voulu accepter d'examiner cette thèse.

Pour la même occasion je tiens à remercier du fond du cœur Soumia, Fahima et Belkacem (membres de l'équipe du projet) pour leur très encourageante solidarité.

Sans oublier de remercier M^{elle} Mokrane Zakia qui a été toujours présente pour m'aider et m'encourager pour la réalisation de ce travail.

Un grand merci à mon école l'ENSSMAL et tous mes professeurs pour leurs aides et leurs encouragements.

Pour finir, merci à toutes les personnes qui ont aidé de près ou de loin par le fruit de leur connaissance pendant toute la durée de mon parcours éducatif.

Résumé :

Les nauplii et les adultes d'Artémia présentent un grand avantage de satisfaire les besoins nutritionnels des différentes espèces aquatiques.

L'étude porte sur l'influence du régime alimentaire, aspect qualitatif et quantitatif, sur la croissance et la survie du Branchiopode « Artemia ».

Une culture en batch de *Chlorella* sp en milieu bold basal a été réalisée sous éclairage (8h/16h). Le suivi de la culture nous a permis de déterminer un taux de croissance spécifique ($\mu = 1.51j^{-1}$). L'analyse biochimique de la biomasse lyophilisée de *Chlorella* sp révèle une teneur faible en substances bioactives dont les lipides et les glucides constituent respectivement (24%, 16.27%). Tandis que la levure boulangère (*Saccharomyces cerevisiae*) a engendré un rendement élevé en ces molécules.

En comparant entre la poudre d'algues lyophilisée de *Chlorella* et la levure boulangère (*Saccharomyces cerevisiae*). Cette dernière a donné les meilleures croissances et survie d'artémia, en raison de sa haute teneur en nutriment et la dissolution parfaite de ses particules dans l'eau de mer.

Mots clés : Artémia, *Chlorella* sp, *Saccharomyces cerevisiae*, croissance.

Abstract

Nauplii and adult of Artemia have a great advantage to meet the nutritional needs of different aquatic species.

The study focuses on the influence of diet, qualitative and quantitative aspect, the growth and survival of branchiopod "Artemia".

A culture of *Chlorella* sp batch in bold basal medium was performed under illumination (8h / 16h). Monitoring culture has allowed us to determine a specific growth rate ($\mu = 1.51j^{-1}$). Biochemical analysis of the lyophilized biomass of *Chlorella* sp reveals a low bioactive substance including fats and carbohydrates are respectively (24%, 16.27%). While baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) has generated a high yield of these molecules.

Comparing between the lyophilized powder of *Chlorella* algae and baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). The latter gave the best growth and survival of brine shrimp (artemia), because of its high nutrient content and perfect dissolution of the particles in seawater.

Key words: Artemia, *Chlorella* sp, *Saccharomyces cerevisiae*, growth.

TABLE DES MATIÈRES

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction.....	01
1^{er} chapitre : Généralités	
I. Généralités sur l' <i>Artémia</i>	02
I.1. Définition.....	02
I.2. Taxonomie.....	02
I.3. Morphologie	02
I.4. Reproduction d' <i>Artémia</i>	03
I.5. Utilisation et valeur nutritionnelle d' <i>Artémia</i>	05
I.6. Production d' <i>Artémia</i>	06
I.6.1. Choix des cystes	06
I.6.2. Etapes de production.....	06
II. Alimentation d' <i>Artémia</i> en élevage	08
II.1. <i>Chlorella</i> sp (microalgue verte)	08
II-1-1- Systématique	08
II-1-2- Description	08
II-1-3- Utilisations de la <i>Chlorella</i>	10
II.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levure boulangère)	10
II-2-1- Systématique	10
II-2-2- Description	10
II-2-3- Utilisations de la levure.....	12
2^{ème} chapitre : Matériel et méthodes	
I. Matériels.....	13
I.1. Matériel biologique	13
I.2. Matériel non biologique	13
II. Méthodes.....	14
II.1. Culture de la microalgue <i>Chlorella</i> sp	14
II.1.1. Mode de culture et de nutrition entrepris	14
II.1.2. Procédure de la culture.....	14
II.1.3. Choix des conditions d'incubations	15
II.1.4. Analyses biométriques	15
II.1.5. Calcul du taux de croissance spécifique.....	17

II.1.6. Récolte	17
II.1.7. Lyophilisation.....	18
II.2. Analyses biochimiques.....	19
II.2.1. Dosage des lipides	19
II.2.2. Dosage des glucides	20
II.2.3. Dosage des protéines	21
II.3. Elevage d'Artémia	23
II.3.1. Incubation des cystes.....	23
II.3.2. Calcul du taux d'éclosion des cystes.....	23
II.3.3. Récupération des nauplii	24
II.3.4. Comptage des nauplii	24
II.3.5. Nutrition des nauplii.....	26

3^{ème} chapitre : Résultats et discussions

I. Résultats de la culture de la microalgue <i>Chlorella</i> sp.....	28
I.1. Cinétique de croissance de l'espèce <i>Chlorella</i> sp cultivée en BBM.....	28
I.2. Détermination du taux de croissance spécifique	28
II. Résultats des analyses biochimiques	29
II.1. Comparaison de la composition biochimique de la microalgue <i>Chlorella</i> sp	29
II.2. Comparaison de la composition biochimique de la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
II.3. Comparaison entre la composition biochimique de la microalgue <i>Chlorella</i> sp et la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
III. Elevage de l'Artémia.....	31
III.1. Suivi de l'éclosion des cystes	31
III.2. Taux d'éclosion des cystes	32
III.3. Suivi de la croissance des nauplii	32
Conclusion.....	39
Références bibliographiques.....	40
Annexes	

LISTE DES FIGURES

Figure 01 : <i>Artémia</i> sp	02
Figure 02 : Morphologie d' <i>Artémia</i>	03
Figure 03 : Cycle de vie d' <i>Artémia</i>	04
Figure 04 : Reproduction des Artémias.....	05
Figure 05 : <i>Chlorella</i> sp	08
Figure 06 : Morphologie de la microalgue <i>Chlorella</i>	09
Figure 07 : Schéma représentant la formation d'autospores chez <i>Chlorella vulgaris</i>	09
Figure 08 : <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
Figure 09 : Représentation schématique d'une cellule de levure indiquant les éléments morphologiques typiques.....	11
Figure 10 : Le cycle de la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
Figure 11 : Le matériel biologique utilisé	13
Figure 12 : Les étapes de la culture de la microalgue <i>Chlorella</i> sp	15
Figure 13 : Lyophilisation de la microalgue <i>Chlorella</i> sp.....	18
Figure 14 : Dosage des lipides.....	19
Figure 15 : Méthodes de traçage de la courbe d'étalonnage des glucides.....	20
Figure 16 : Les étapes de dosage des protéines.....	21
Figure 17 : Récupération des nauplii	23
Figure 18 : Comptage des nauplii	24
Figure 19 : Schéma représentant l'élevage d'artémia dans les bouteilles de Zoug.....	26
Figure 20 : Nombre de cellules de <i>Chlorella</i> sp cultivée en BBM	28
Figure 21 : Etapes d'éclosion des cystes d' <i>Artémia</i> observés au grossissement GX40 . ..	31
Figure 22 : Taille moyenne des larves d' <i>Artémia</i> au 2 ^{ème} jours, en fonction de la quantité de nourriture distribuée.....	34
Figure 23 : Taille moyenne des larves d' <i>Artémia</i> au 4 ^{ème} jours, en fonction de la quantité de nourriture distribuée.....	34

Figure 24 : Taille moyenne des larves d'Artémia au 6 ^{ème} jours, en fonction de la quantité de nourriture distribuée.....	35
Figure 25 : Taille moyenne des larves d'Artémia au 8 ^{ème} jours, en fonction de la quantité de nourriture distribuée.....	35
Figure 26 : Comparaison des tailles moyennes des larves d'Artémia aux 2, 4, 6 et 8 jours, en fonction de la même quantité de nourriture distribuée.	37
Figure 27 : Différence de couleur d'artémia alimenté par la microalgue (<i>Chlorella</i> sp) et la levure (<i>Saccharomyce cerevisiae</i>) observée au microscope optique au grossissement GX 100	38
Figure 28 : La reproduction sexuée d' Artémia observé sous la loupe binoculaire.	37

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01: Les modalités de la reproduction d'Artémia	05
Tableau 02 : Comptage du nombre des nauplii	24
Tableau 03: Quantités de nourriture distribuée en fonction du temps	25
Tableau 04 : Résultats de calcul du taux de croissance de la culture de <i>Chlorella</i>	28
Tableau 05 : Résultats des analyses biochimiques de <i>Chlorella</i> sp et <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
Tableau 06 : Résultats de la composition biochimique de <i>Chlorella</i> sp	29
Tableau 07 : Résultats de la composition biochimique de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
Tableau 08 : Résultats de la composition biochimique de <i>Chlorella</i> sp et <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
Tableau 09 : Résultats de comptage de nombre des cystes et nauplii.....	32
Tableau 10 : Résultats des tailles moyennes obtenus à partir de différentes quantités de nourriture distribuées chaque 2 jours.	33
Tableau 11 : Comparaison entre les tailles moyennes des larves d'artémias alimentés par <i>Chlorella</i> et la levure.....	37

LISTE DES ABREVIATIONS

AGLPI : acides gras longs polyinsaturés.

A₀ : nauplii nouvellement éclos (stade I).

A₁ : nauplii pour élevage (stade II).

BG11: Milieu Blue- Green.

BBM: Milieu Bold Basal.

C : moyenne des cystes.

N : moyenne des nauplii.

V : volume.

Introduction

En aquaculture, le succès d'élevage aquacole dépend surtout de la disponibilité d'une nourriture abondante et adéquate pour les jeunes stades. Le phytoplancton et le zooplancton sont une source de nourriture. Les aliments vivants comme les artémias et les rotifères sont encore reconnus comme les meilleurs aliments pour poissons et crustacés (Sorgeloos et al., 1993).

L'Artémia adulte fournit un aliment de qualité, riche en protéines complètes (environ 60% de protéines) qui donnent une meilleure survie, un taux de croissance plus rapide, et un développement de la couleur plus complète que la plupart des autres régimes. Les adultes d'Artémia sont actuellement utilisés pratiquement dans toutes les écloséries. Plus de 85% de tous les animaux marins sont cultivées en utilisant l'Artémia comme un régime alimentaire partiel ou entier (Hoff et al., 2001).

Le présent travail consiste en l'enrichissement de l'Artémia en donnant comme nourriture la microalgue *Chlorella* sp autochtone et la levure *Saccharomyces cerevisiae*. 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 production de nourriture de haute valeur nutritionnelle à partir d'Artémia pour les poissons et les crustacés ».

Ce présent manuscrit est composé de trois chapitres, généralités, matériel et méthodes et résultats et discussion. Le premier chapitre renferme une description de l'espèce d'Artémia (morphologie, cycle de reproduction), et son alimentation en élevage par la microalgue *Chlorella* sp et la levure boulangère *Saccharomyces cerevisiae*.

Le deuxième chapitre décrit en détail les méthodes adoptées pour réaliser ce travail y compris la culture de la microalgue *Chlorella* sp, les analyses biochimiques effectuées sur les deux aliments et enfin procédure de l'alimentation de l'Artémia par la microalgue *Chlorella* sp et la levure *Saccharomyces cerevisiae* en utilisant la croissance comme facteur d'évaluation.

Les résultats obtenus ainsi que les discussions sont assemblés dans le troisième chapitre du document.

Cette étude s'achève par une conclusion.

1^{er} chapitre :
Généralités

I. Généralités sur l'Artémia :

I.1. Définition :

L'artémia est un petit crustacé branchiopode vivant dans les eaux saumâtres, les lacs salés, les lagunes du monde entier. Il supporte de fortes salinités et est très eurytherme (0-30°C). C'est un filtreur non sélectif de phytoplancton, de bactéries, de levures. Il existe de nombreuses souches (espèces) du genre *Artémia*. L'origine de l'espèce est en relation avec son milieu de vie (Ferra, 2008).

I.2. Taxonomie :

La taxonomie d'Artémia est comme suivant :

<u>Règne</u>	Animalia
<u>Embranchement</u>	Arthropoda
<u>Sous-embr.</u>	Crustacea
<u>Classe</u>	Branchiopoda
<u>Sous-classe</u>	Sarsostraca
<u>Ordre</u>	Anostraca
<u>Sous-ordre</u>	Artemiina
<u>Famille</u>	Artemiidae
<u>Genre</u>	Artemia

(Linnaeus, 1758).



Figure 01 : *Artémia* sp (Taxacher, 2012).

I.3. Morphologie :

L'Artémia est un arthropode primitif typique avec un corps segmenté auquel sont fixés de larges appendices semblables à des feuilles. Le corps se compose généralement de 19 segments, le premier segment comporte 11 paires d'appendices, les deux suivants sont souvent fusionnés portent les organes reproducteurs, et les derniers segments conduisent à la queue (Hickman, 1967). La longueur totale est habituellement d'environ 8-10 millimètres pour le mâle adulte et 10-12 mm pour la femelle, mais la largeur des corps des deux sexes, y compris les jambes, est d'environ 4 mm.

Le corps d'Artémia est composé de la tête, du thorax et de l'abdomen (figure 2). Le corps entier est recouvert d'un mince et souple exosquelette de chitine (Criel et al., 2002).

Chez la femelle d'Artémia une mue précède chaque ovulation (Hickman, 1967). Artémia possède deux types d'yeux. Deux yeux composés sont largement séparés, montés sur des tiges flexibles. Ces yeux composés sont l'organe sensoriel optique principal d'Artémia adultes. L'œil médiane, ou l'œil nauplius, est situé en avant dans

le centre de la tête et est le seul organe des sens optiques fonctionnels dans le nauplius jusqu'au stade adulte (Criel *et al.*, 2002).

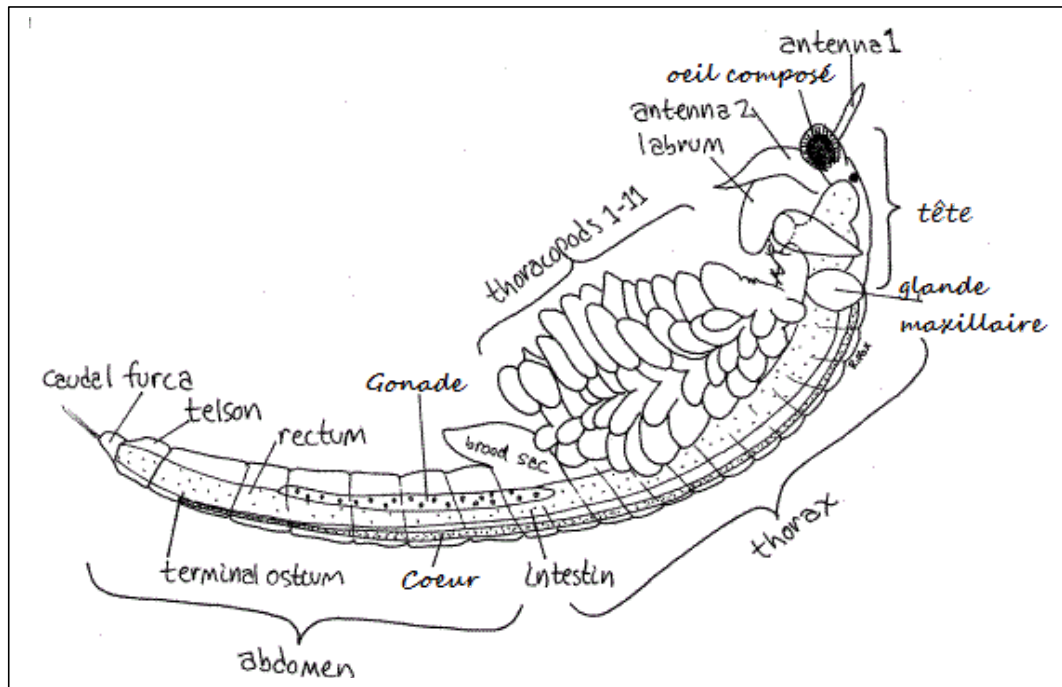


Figure 02 : Morphologie d'Artémia sp (Fox, 2006).

I.4. Reproduction d'Artémia :

Au cours de l'accouplement le mâle se rapproche de la face dorsale de la femelle et la tient par sa seconde antenne élargie. Le mâle tord son corps autour de la femelle, puis les pénis sont insérés dans la poche incubatrice à fin de déposer le sperme. Les partenaires restent collés pendant plusieurs heures au cours desquelles la copulation peut se produire au bout de quelques minutes. Les œufs sont libérés dans la poche incubatrice où ils sont fécondés et recouverts d'une coquille.

Deux types d'œufs sont produits. Un œuf a une coque mince et éclos dans la poche incubatrice. L'autre, connu comme l'œuf de repos (cyste dormant), a une lourde carapace et peut rester viable pendant plusieurs années hors de l'eau, puis éclos lorsqu'il est immergé dans l'eau salée. Les deux types d'œufs éclosent en larves nauplius (figure 03) (Vos *et al.*, 1980).

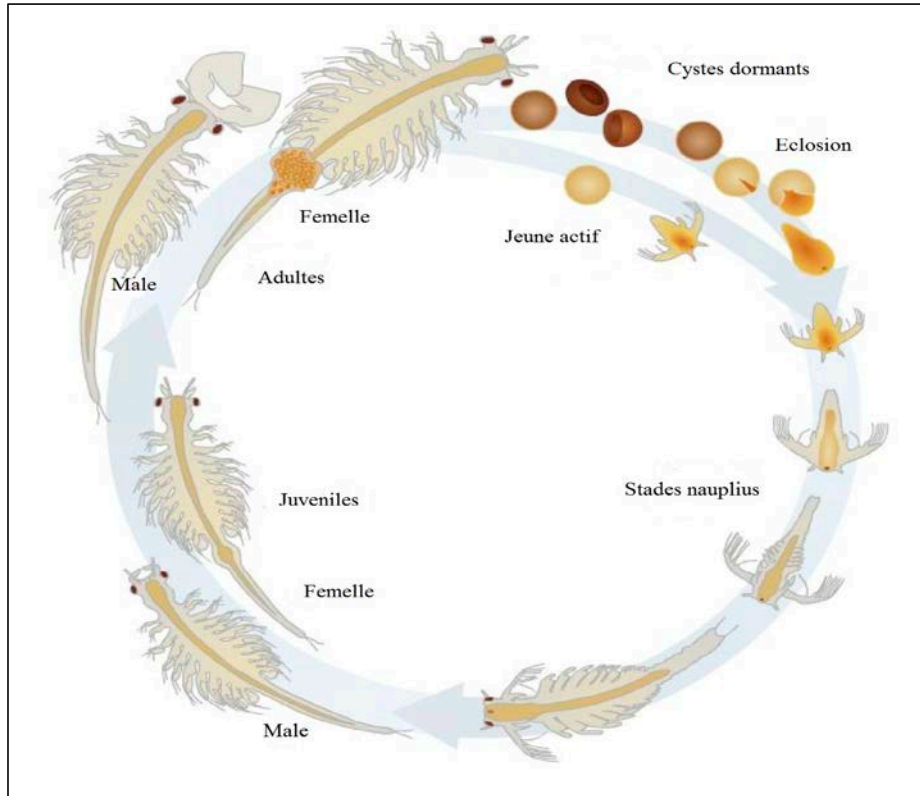


Figure 03 : Cycle de vie d'Artémia (Anonyme 1)

L'artémia comprend deux modes de reproduction, l'une ovovivipare où après la fécondation, les œufs se développent immédiatement sous forme nauplii dans la poche incubatrice de la femelle. Ces nauplii sont ensuite relâchés dans l'eau et nagent librement (Vos et al., 1980). L'autre ovipare, amenant à des œufs très déshydratés (cystes), où l'embryon est en diapause. Cette particularité du cycle rend l'Artémia très utile en aquaculture car il est alors possible d'obtenir des proies vivantes facilement stockables à partir de ces cystes déshydratés. L'œuf se conserve longtemps et se réactive dès qu'on l'immerge (figure 04), (Ferra, 2008).

Les modalités de la reproduction d'artémia (ovipare, ovovivipare) sont contrôlés par les facteurs environnementaux sont représentées dans le tableau 01.

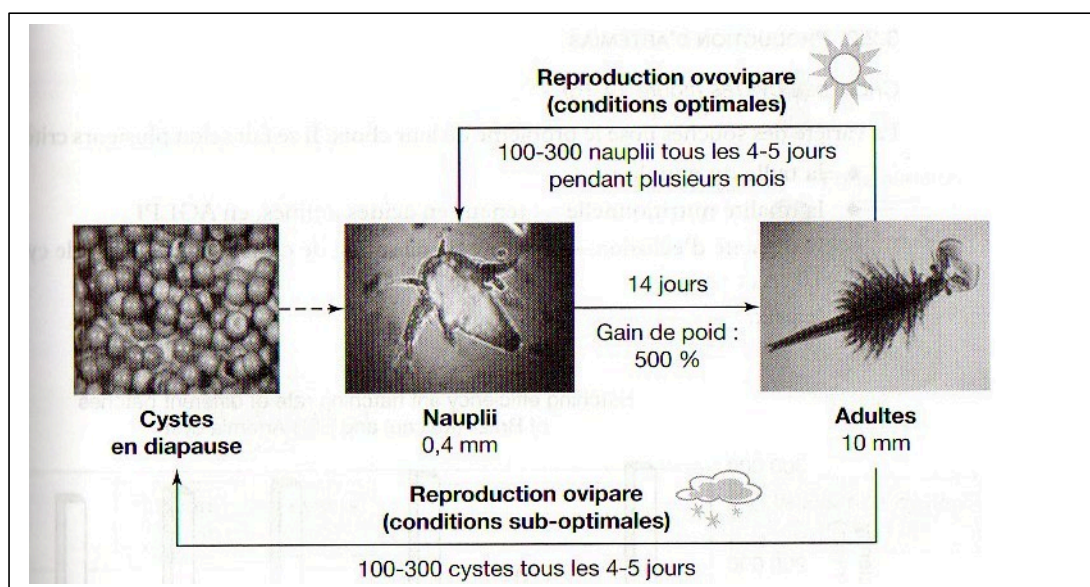


Figure 04 : Reproduction des Artémias (Ferra, 2008).

Tableau 01 : les modalités de la reproduction d'Artémia (Dumitrascu, 2011).

Reproduction	
ovipares	ovovivipares
teneur faible en O ₂ , haute salinité	teneur élevée en O ₂ , faible salinité
forte fluctuations d'O ₂	faible fluctuations d'O ₂
Aliments riches en Fer (comme les algues vertes)	Aliments à basse teneur en Fer (tels que les débris organiques)

I.5. Utilisation et valeur nutritionnelle d'Artémia :

L'Artémia est un excellent aliment pour une grande variété de culture marine et organismes d'eau douce (Léger *et al.*, 1987).

Elle est utilisée comme une nourriture vivante pour la pisciculture depuis les années 1920. Son utilisation généralisée dans l'aquaculture a amélioré à la fois la disponibilité et la qualité des cystes. Les cystes sont facilement disponibles. Dès leur éclosion ils fournissent directement des nauplii d'Artémia pour les poissons d'eau douce et marins et des invertébrés (Hoff *et al.*, 2001).

Bien qu'en aquaculture l'Artémia soit, la plupart du temps, utilisée sous forme de nauplius fraîchement éclos, les adultes présentent un intérêt certain car ils contiennent 60% de protéines, sont très riches en acides aminés essentiels, en acides gras polyinsaturés et ne contiennent que 10% de cendres (Barnabé, 1989).

I.6. Production d'Artémia :

La production d'artémia ou l'élevage se réalise en suivant respectivement les étapes suivantes :

I.6.1. Choix des cystes :

La variété des souches pose le problème de leur choix. Il se fait selon plusieurs critères (Ferra, 2008) :

- La taille du nauplii.
- La qualité nutritionnelle- teneur en acides aminés, en AGLPI.
- Taux d'éclosion.
- Le prix.

I.6.2. Etapes de production :

La production d'artémia comporte diverses phases, selon la proie voulue (Lavens et al., 1996 ; Hoff et al., 2001 ; Ferra, 2008) :

- a. Hydratation ;
- b. Incubation ;
- c. Récolte des nauplii ;
- d. Production d'Artémia enrichis

a. Hydratation : elle permet de réactiver le métabolisme de l'embryon. Elle consiste à introduire environ 100g de cystes/litre d'eau douce à 25°C, avec forte aération pendant une heure.

b. Incubation : elle se déroule dans un bac souvent cylindro-conique à une concentration qui varie entre 2 et 5g de cystes/litre (réservé aux volumes < 20l). L'eau du bac est préalablement désinfectée.

Les conditions d'incubations :

- La **température** est située entre 27 -28°C
- La **salinité** est comprise entre 30- 35‰. Le temps d'éclosion le plus rapide est obtenu à faible salinité (5-10‰).

- Le **pH** : l'intervalle du pH est de 8-8.5. si l'incubation a lieu à faible salinité, il faut ajouter de 0.5 à 2 g/l de NaHCO₃ pour augmenter le pouvoir tampon ; même chose si l'incubation se déroule à forte densité (production de CO₂) (**Ferra, 2008**). selon **Lavens et al., (1996)**, le pH ne doit pas être inférieur à 7.5.
- L'**Oxygène** : la concentration d'O₂ est de 2- 5mg/l.
- L'**éclairage lumineux** est de 2000 lux. Son rôle est mal connu, mais si la lumière est trop atténuée on observe un impact négatif sur l'éclosion (**Hoff et al., 2001 ; Ferra, 2008**).
- La **densité d'incubation** est de 2- 5g de cystes/l. la densité interfère avec les autres facteurs (pH, O₂, accès à la lumière...).

c. Récolte des nauplii (A₀) :

Afin de séparer les nauplii des débris du bac (coquilles vides, cystes non éclos, débris organiques) un protocole de récolte en trois étapes est utilisé :

1. **Décantation** : l'arrêt du bullage permet la décantation. Les coquilles vides flottent en surface ; les nauplii restent dans la masse d'eau alors que les cystes non éclos ainsi les débris décantent au fond du cône. la purge permet d'éliminer ces derniers (assez vite pour éviter un problème d'O₂).
2. **Concentration** : le bac est déposé dans le noir, et éclairé dans sa partie inférieure (hublot). Les nauplii ayant un phototactisme positif vont se concentrer au fond du bac, et se séparent aussi des coquilles vides.
3. **Récolte** : les nauplii sont récupérés par tamisage (<120µm), en évitant la récupération des coquilles.

Suite à la récolte, les nauplii sont rincés afin d'éliminer d'éventuels métabolites d'éclosion (glycérol). Par la suite le dénombrement est effectué.

Les nauplii récoltés sont alors :

- ◆ Soit directement utilisés comme proies ;
- ◆ Soit stockés en eau froide pour une utilisation plus tardive (eau à 35‰ de NaCl, 4 à 10°C, 5000 A₀/ml, aération), mais ne dépassant pas 24h (le froid ralentit le métabolisme et donc la proie garde sa valeur nutritive).
- ◆ Soit remis en élevage dans un autre bac pour produire des métonauplii enrichis.

d. Production d'Artémia (A₁) enrichis :

La valeur nutritive des proies en éclosérie marine dépend essentiellement de leur teneur en AGLPI (acides gras longs polyinsaturés) de la série Oméga3- EPA (acide eicosapentanoïque : 20- 5 Oméga3) et DHA (acide docosahexanoïque : 22- 6 Oméga3), ainsi que de leur profil en acides aminés essentiels (**Ferra, 2008**).

Pour assurer leur qualité, un enrichissement ou dopage est pratiqué sur ces proies en utilisant différentes moyennes (phytoplancton, levures).

Le taux de survie est généralement de 80%. La récolte se fait sur tamis de 200µm, et la distribution intervient après rinçage et comptage. Là encore, peuvent être stocké en eau froide (**Ferra, 2008**).

II. Alimentation d'artémia en élevage :

Toutes les espèces d'algues unicellulaires et les levures sont considérées comme aliments appropriés pour soutenir la croissance d'Artémia (**Lavens et al., 1996**).

II.1. *Chlorella* sp (microalgue verte) :

II.1.1. Systématique :

Phylum : Chlorophyte

Classe : Chlorophycée

Ordre : Chlorococcale

Famille : Oocystacée

Genre : *Chlorella*

Espèce : *Chlorella* sp (**Bourrelly, 1966**)

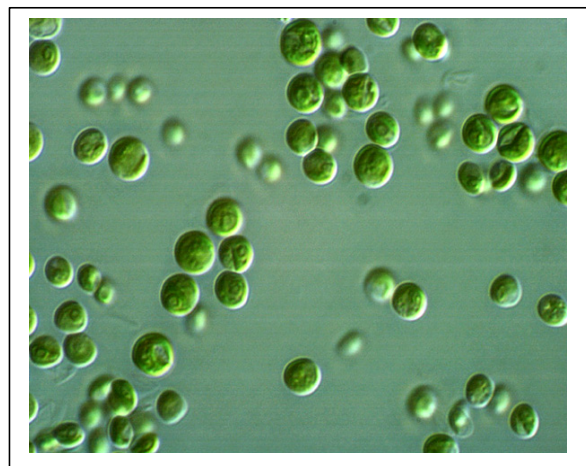


Figure 05 : *Chlorella* sp (**Baker et al., 2012**)

II.1.2. Description :

Les cellules sont toujours solitaires, sphériques ou ellipsoïdales, plus rarement réniformes ou asymétriques, à membrane distincte, avec un ou rarement deux plastes, parfois un pyrénioïde (**Bourrelly, 1966**).

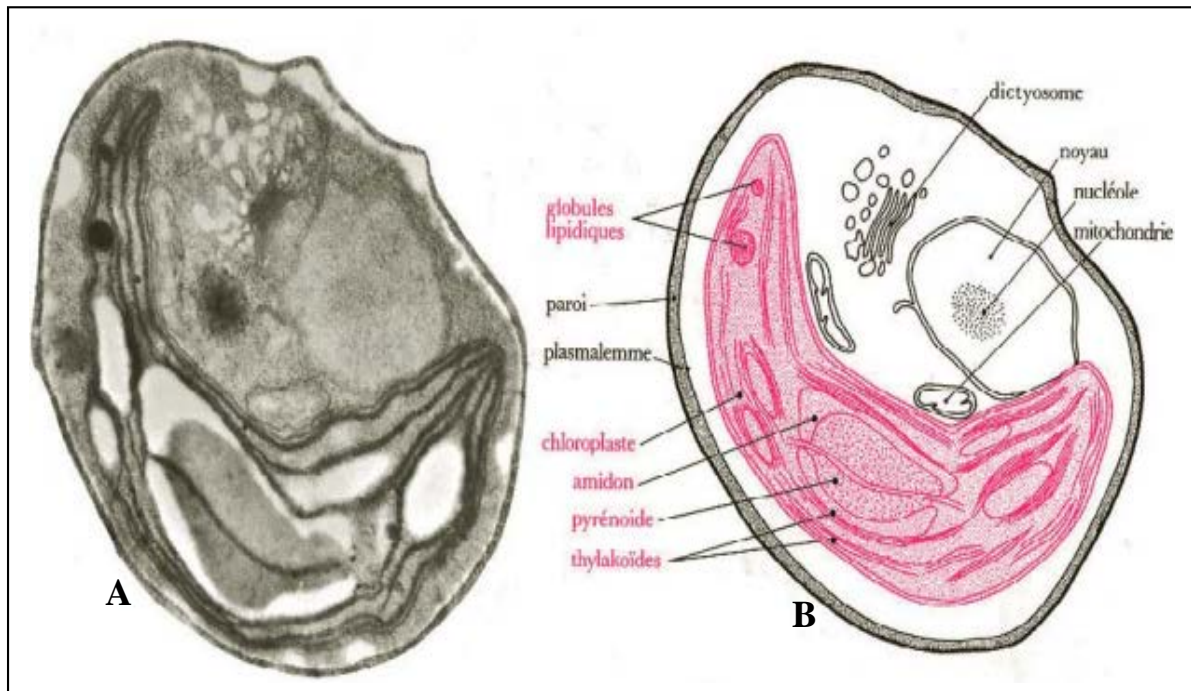


Figure 06 : Morphologie de la microalgue *Chlorella* (Roland et al., 2008).
A : Micrographie électronique d'une cellule de *Chlorella* .**B :** représentation schématique d'une cellule de *Chlorella*.

La multiplication se fait par 2, 4, 8, 16, autospores libérées par rupture de la membrane maternelle (Bourelly, 1966).

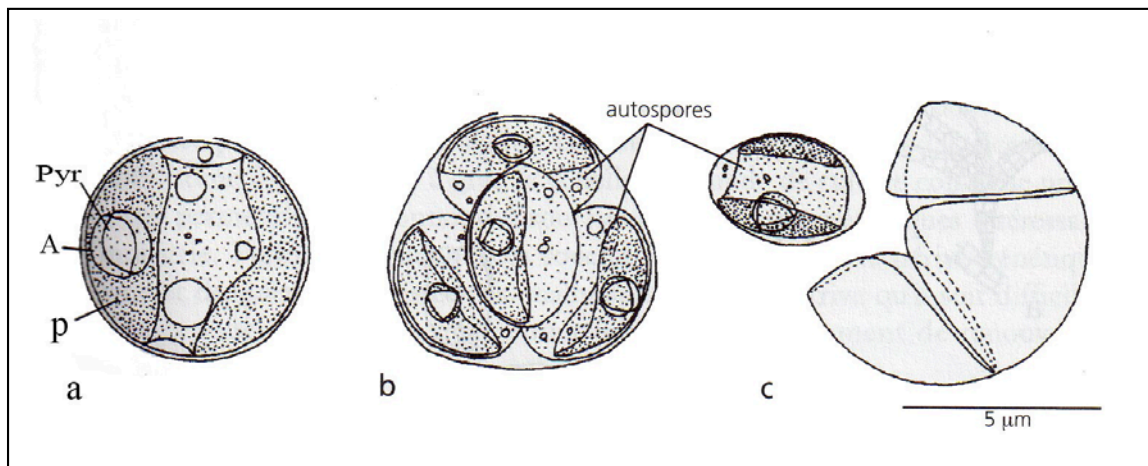


Figure 07 : Schéma représentant la formation d'autospores chez *Chlorella vulgaris*.
a. cellule végétative. **b.** formation des autospores. **c.** libération des autospores. **A=** amidon.
Pry= pyrénioïde. (d'après Fott et Nováká, 1969, redessiné d'après Van den Hoek et al., 1995) in Reviers, (2002) .

II.1.3. Utilisation de la *Chlorella* :

- ❖ la chlorelle est utilisée comme aliment en aquaculture pour les larves des mollusques et des crevettes ou pour les proies qui sont données pour les larves de poissons (Spolaore et al., 2006).
- ❖ *Chlorella vulgaris* est aussi largement utilisée dans l'aquaculture pour nourrir des rotifères (Muller-Fuega, 2000).
- ❖ *Chlorella* sp est une source de nourriture populaire pour les rotifères et les daphnies (Hoff et al., 2001).

II.2. *Saccharomyces cerevisiae* (levure boulangère) :

II.2.1. Systématique :

La taxonomie de la levure est la suivante :

<u>Règne</u>	Fungi
<u>Division</u>	Ascomycota
<u>Sous-embr.</u>	Saccharomycotina
<u>Classe</u>	Saccharomycetes
<u>Sous-classe</u>	Saccharomycetidae
<u>Ordre</u>	Saccharomycetales
<u>Famille</u>	Saccharomycetaceae
<u>Genre</u>	Saccharomyces
<u>Espèce</u>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Meyen, 1883).

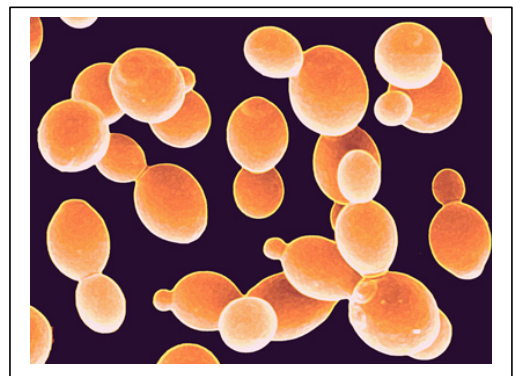


Figure 08 : *Saccharomyces cerevisiae* (Ian, 2013)

II.2.2. Description :

Une levure est un champignon unicellulaire possédant un seul noyau. Généralement, les cellules de levures sont plus grandes que les bactéries, leur taille varie considérablement, elles sont généralement sphériques ou ovoïdes. Elles n'ont pas de flagelle, mais possèdent la plupart des organites des autres cellules eucaryotes (Prescott et al., 2010).

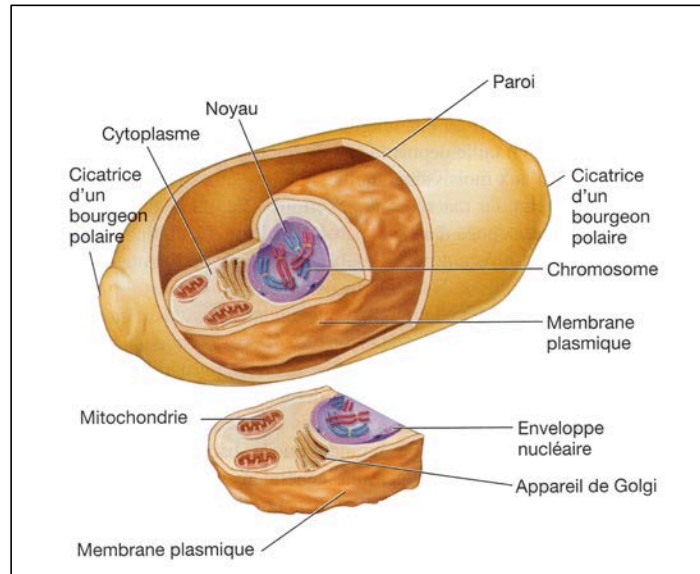


Figure 09 : Représentation schématisique d'une cellule de levure indiquant les éléments morphologiques typiques (**Prescott et al., 2010**).

La levure se reproduit soit de façon asexuée par bourgeonnement et division transversale, soit de façon sexuée avec formation de spores (**Herskowitz, 1988 ; Prescott et al., 2010**). Chaque bourgeon, qui se sépare, donne une nouvelle levure et certains restent groupés pour former des colonies.

La division par bourgeonnement conduit à une division asymétrique et la formation d'une cellule fille plus petite (figure 10.a).

Quand la nourriture est abondante, les cellules haploïdes et diploïdes subissent des mitoses et se développent végétativement. Lorsque la nourriture manque, les cellules diploïdes entrent en méiose pour produire quatre cellules haploïdes qui restent solidaires dans une paroi commune, l'asque. Si la nourriture est à nouveau disponible, deux cellules haploïdes de type conjugatif opposé (a et α) fusionnent pour créer une cellule diploïde (figure 10.b) (**Prescott et al., 2010**).

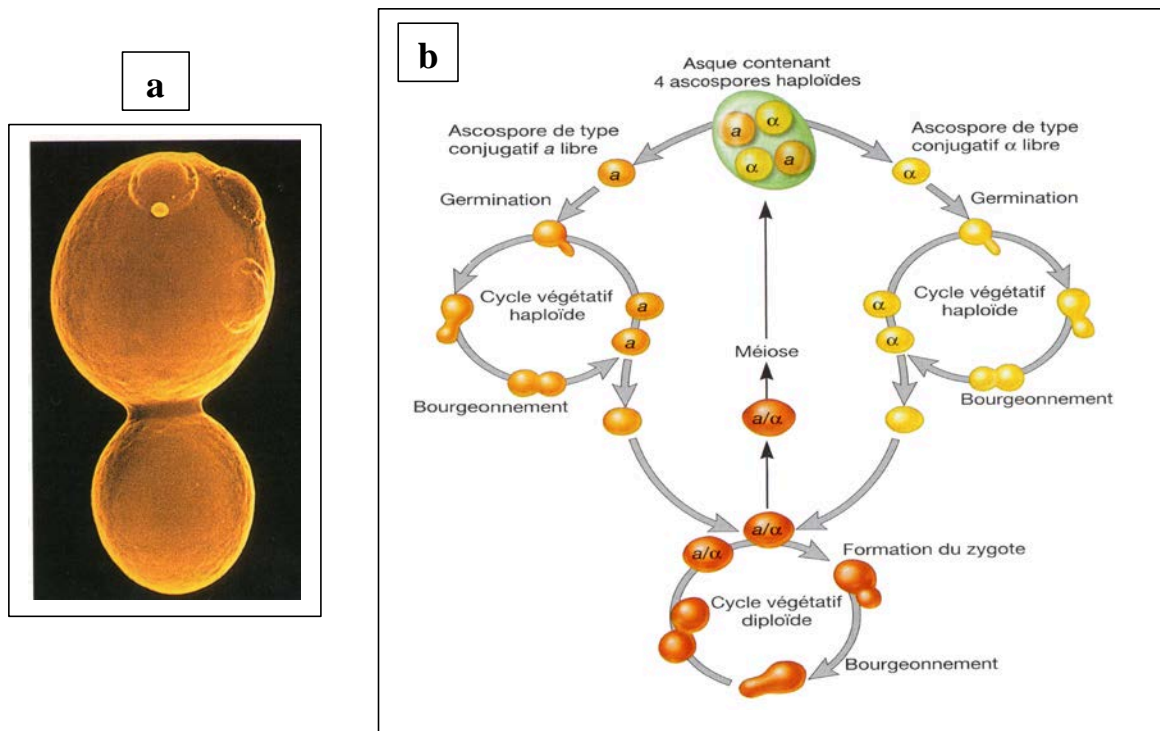


Figure 10 : Le cycle de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Prescott et al., 2010).
a. division par bourgeonnement. **b.** cycle biologique de *S. cerevisiae*.

II.2.3. Utilisations de la levure :

- ❖ De nombreuses études ont prouvé que les produits de levure (levure de boulangerie) constituent une bonne source de protéines dans les régimes alimentaires pour la production de biomasse des Artémias, (Talloen, 1978 ; James et Makkeya, 1981).
- ❖ la levure peut être donnée comme aliment ou complément avec les microalgues qui donne de bons résultats concernant la croissance et la valeur nutritionnelle d'Artémia (Coutteau et al., 1992).

2^{ème} chapitre :

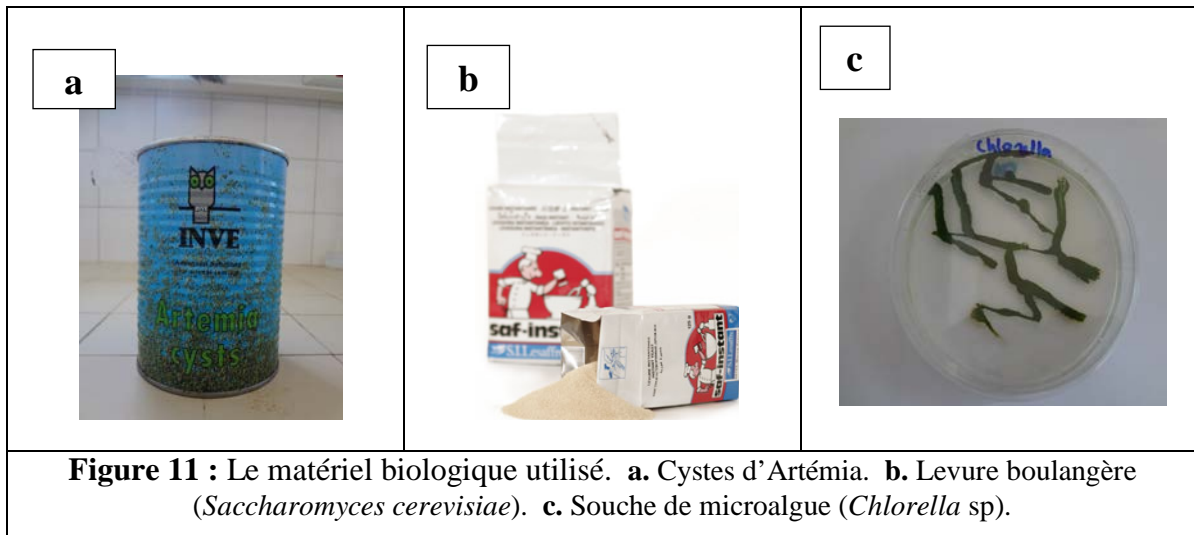
Matériel et méthodes

Les expériences ont été réalisées au niveau de laboratoire des écosystèmes aquatiques du Centre National de Recherche et Développement de la Pêche et de l'Aquaculture (CNRDPA) situé à Bou Ismaïl Wilaya de Tipaza.

I. Matériel :

I.1. Matériel biologique :

1. **Artémia** : les cystes sont disponibles au niveau du CNRDPA, produite par « INVE Aquaculture Nutrition » en USA et commercialisés sous la marque « Artemia cysts » (figure 11.a).
2. **Saccharomyces cerevisiae** (levure boulangère) : la marque « Saf-instant » fabriqué en France disponible au marché (figure 11.b).
3. **Chlorella sp** : espèce de microalgue d'eau douce prélevée par une équipe de chercheurs de CNRDPA à partir du lac El Goléa situé à Méria wilaya de Ghardaïa, en Octobre 2011, isolée, purifiée et conservée dans des boîtes de Pétri (figure 11.c) contenant du milieu BG11 (dont la composition du milieu est figuré en Annexe I).



I.2. Matériel non biologique :

Le matériel utilisé pour nos expérimentations est illustré dans l'annexe II.

II. Méthodes :

II.1. Culture de la microalgue *Chlorella* sp:

II.1.1. Mode de culture et de nutrition entrepris :

On a choisi la culture en batch pour suivre le développement et la croissance de la microalgue dans leur milieu de culture. La nutrition s'est faite par autotrophie.

II.1.2. Procédure de la culture :

➤ Inoculation Initiale :

A partir d'une boîte de Pétri contenant la Chlorelle pure, on a introduit des colonies dans des tubes à essai contenant 10 ml de milieu de culture liquide (BBM) (dont la composition figure en Annexe III) (Jayashree et al., 2012).

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).

➤ La culture :

Après une incubation de 5 jours, les tubes contenant l'inoculum servent à l'ensemencement des Erlen de 250 ml contenant 200 ml du milieu de culture. Ces derniers sont incubés 5 à 7 jours, la culture est ensuite utilisée comme inoculum. Deux milieux de culture de 600 ml de volumes sont utilisés, l'un sert à l'ensemencement d'un volume de 5 litres, contenu dans un jerrican. L'autre sert à la réalisation des analyses. La Figure 12 résume toutes les étapes de la culture.

Les manipulations ont été entreprises en respectant les conditions suivantes :

∞ Les tubes et les Erlen servant au repiquage sont remplis de milieu de culture. Ils sont ensuite bouchés avec du coton et fermés avec du papier aluminium puis stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 10 minutes.

∞ Le repiquage se fait en zone stérile, dans des conditions aseptiques.

∞ Un contrôle régulier au microscope optique permet de s'assurer de la non contamination des souches par d'autres souches ou par des bactéries.

II.1.3. Choix des conditions d'incubations :

Les paramètres qui influent sur la croissance des microalgues sont :

- **Température d'incubation** : Jayashree et al., (2012) a rapporté que l'espèce *Chlorella* sp pousse bien à une température de 25°C.
- **Lumière artificielle** : L'intensité lumineuse est généralement situé entre 2000 - 3000 lux à la surface de récipients de culture (Stanier et al., 1971).
- **Photopériode** : le cycle de lumière/obscurité est de (8h/16h) (Lavens et al., 1996).
- **Bullage** : l'aération contient la source de carbone pour la photosynthèse, sous forme de dioxyde de carbone CO₂ (Lavens et al., 1996).

II.1.4. Analyses biométriques :

Il y a plusieurs moyens d'évaluation de la quantité de microalgues présentes dans les cultures (Barnabé, 1989). Parmi les techniques, le comptage du nombre de cellules est choisi. Un volume de 600 ml de milieu de culture sert au comptage.

∞ Comptage du nombre de cellules :

Le comptage se fait sous microscope optique à l'aide d'un hémacytomètre (lame Malassez) dont le principe est décrit en Annexe IV (Barnabé, 1989).

Les microalgues sont prélevées par capillarité à l'aide d'une pipette Pasteur, puis sont déposées sur la cellule de Malassez qui est couverte d'une lamelle.

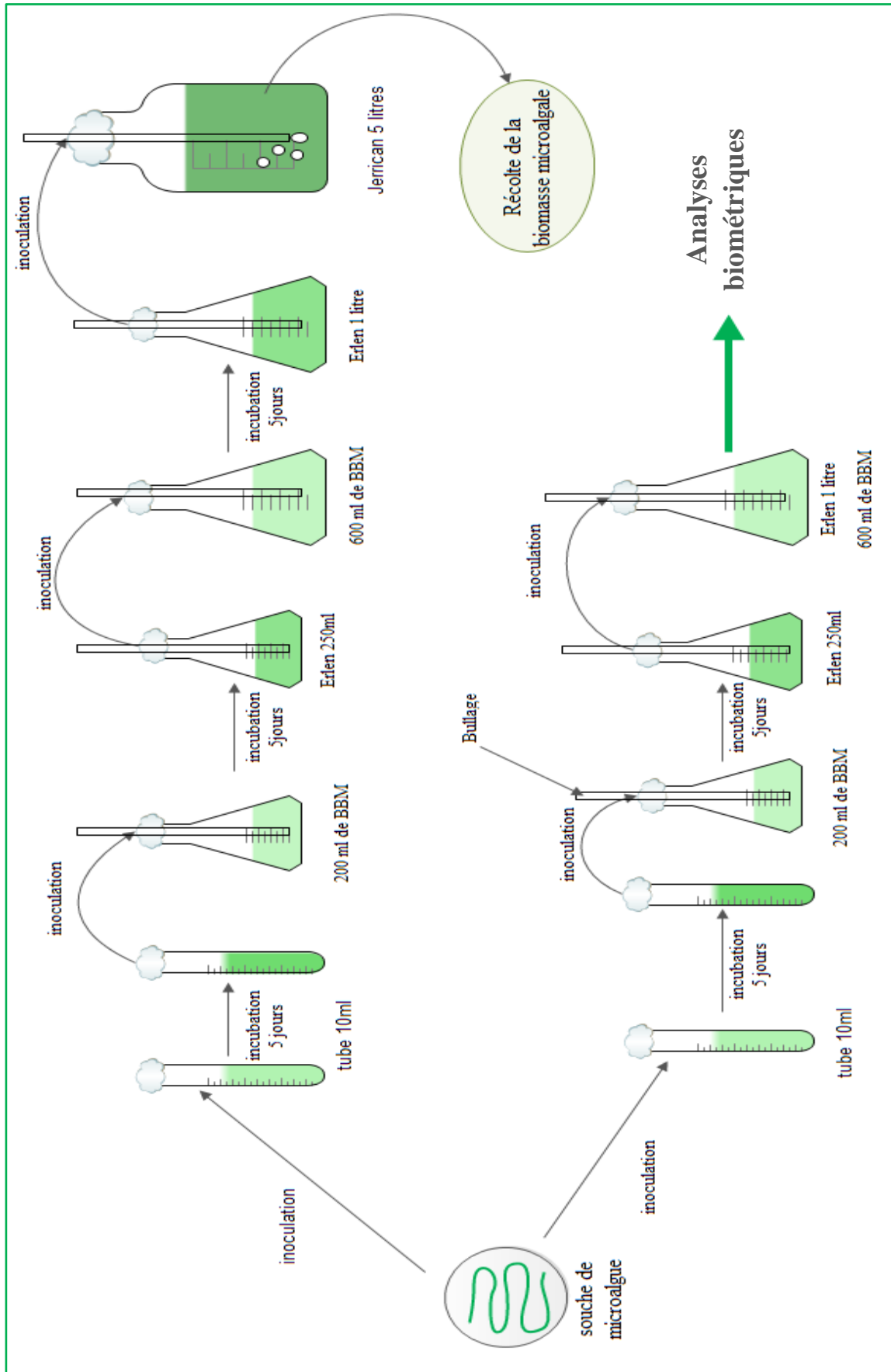


Figure 12 : les étapes de la culture de la microalgue *Chlorella* sp.

II.1.5. 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).

Selon Dev Goswami, (2011), le taux de croissance spécifique (μ , jour) a été mesuré en utilisant l'équation suivante :

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

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).

$$K = \mu / 0.6931$$

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 :

$$T_t = 0.6931 / \mu$$

II.1.6. 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 la technique suivante :

∞ Centrifugation :

Dans des conditions aseptiques nous avons effectué plusieurs centrifugations afin de récupérer la totalité des cellules microalgales.

Les tubes stériles de la centrifugeuse sont remplis de la culture de microalgues puis centrifugés à 5000 tour pendant 15 minutes. Seuls les culots sont récupérés, à l'aide d'une pipette Pasteur stérile. Les culots constitués de microalgues sont déposés dans une boîte de Pétri puis conservés à -4°C .

II.1.7. Lyophilisation :

La lyophilisation, ou anciennement appelée cryodessiccation, est une opération de déshydratation à basse température qui consiste à éliminer par sublimation l'eau d'un produit liquide. Le principe de base est que lorsqu'on réchauffe de l'eau à l'état solide à très basse pression, l'eau se sublime, 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 froid. Cette technique permet de conserver à la fois le volume, l'aspect et les propriétés du produit traité (**Marin et René, 2000**).

On distingue trois phases majeures dans un cycle de lyophilisation (**Richmond, 2004**) :

- **la congélation** : pour solidifier l'eau de la matière microalgale. elle est conservé à une température -4°C ; l'eau se transforme alors en glace.
- **la dessiccation primaire** : elle se produit sous vide. Elle 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.

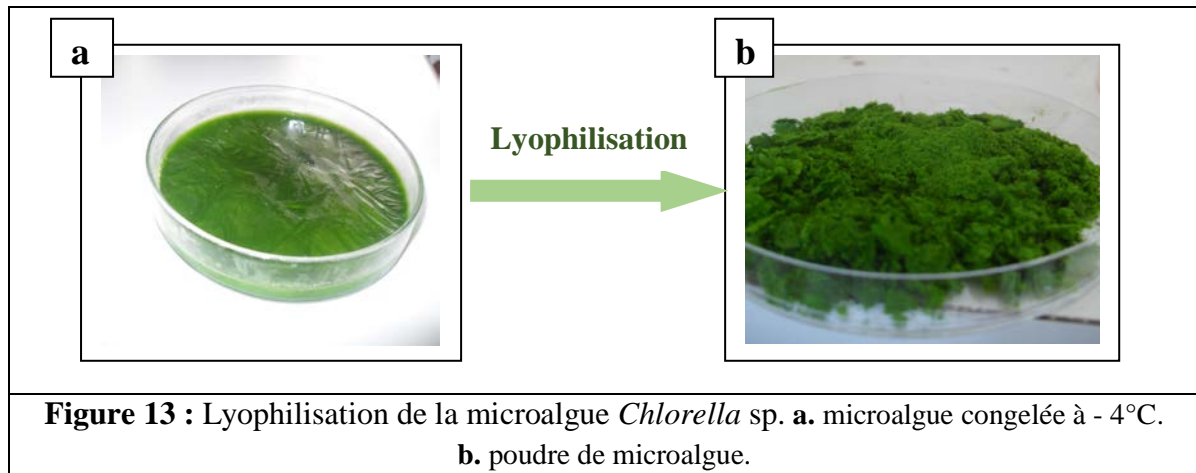


Figure 13 : Lyophilisation de la microalgue *Chlorella* sp. **a.** microalgue congelée à - 4°C.
b. poudre de microalgue.

II.2. Analyses biochimiques :

On a effectué des analyses biochimiques sur la poudre de *Chlorella* sp et la levure boulangère en utilisant les méthodes suivantes :

II.2.1. Dosage des lipides :

Il a été réalisé selon la méthode de **Folch (1957)** modifié par **Christie (1989)**.

- 1g de la poudre de la microalgue (*Chlorella* sp) est homogénéisée avec 10 ml de méthanol pendant 1 minute dans un mélangeur puis 20ml de chloroforme sont ajoutés et le mélange est soumis à une agitation pendant 2 minutes.

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

- Les filtrats réunis sont transférés dans une éprouvette, on ajoute 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 2 fois.

- La phase organique contenant les lipides a été aspirée et filtrée dans une quantité de sulfate de sodium avant que le solvant ne soit éliminé dans un évaporateur rotatif à 68°C.

- Les lipides sont stockés dans un petit volume de chloroforme à - 20 ° C, jusqu'à ce qu'ils puissent être analysés.

∞ **Calcul du rendement :**

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

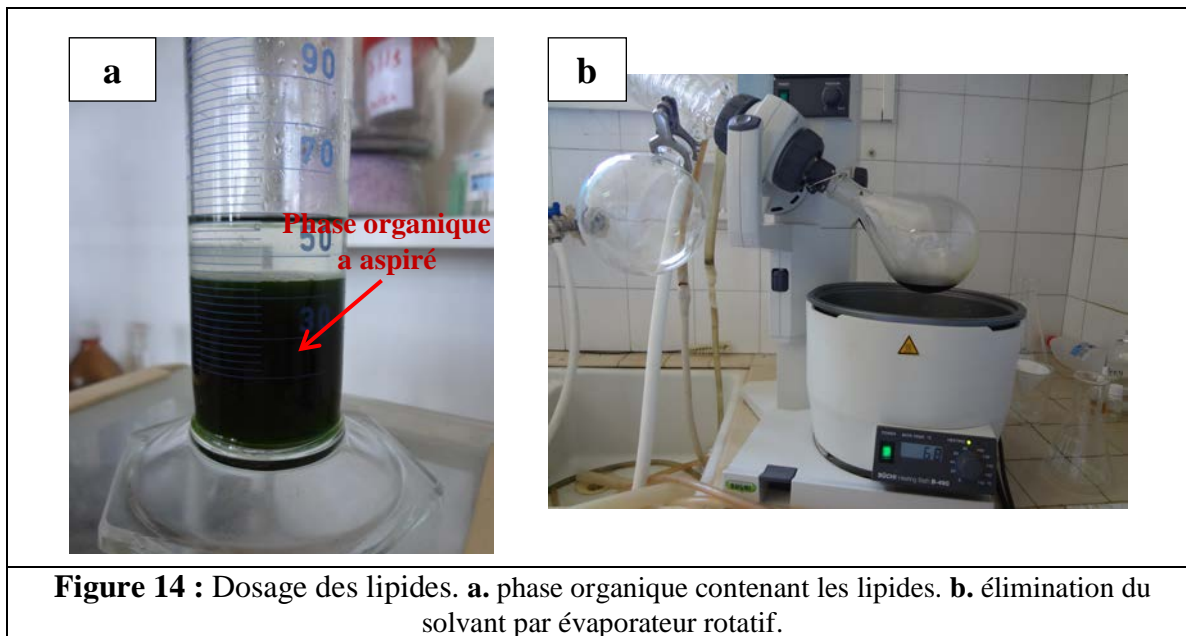


Figure 14 : Dosage des lipides. **a.** phase organique contenant les lipides. **b.** élimination du solvant par évaporateur rotatif.

II.2.2. Dosage des glucides :

Les oses totaux sont dosés selon **Dubois et al., (1956)**. Les glucides donnent une couleur orangée lorsqu'ils sont traités avec du phénol et par l'acide sulfurique concentré. 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.

1. La courbe d'étalonnage :

Introduire 87.5mg du glucose dans 500 ml d'eau distillée, préparer la solution de phénol à 5%. 5 tubes à essais sont remplis de la solution glucose (0ml, 2.5ml, 5ml, 7.5ml, 10ml) puis compléter avec de l'eau distillée jusqu'à 10 ml. Ajouter 1ml de la solution phénol + 5ml de H₂SO₄. Les tubes sont placés au bain Marie à 30°C pendant 20 minutes, puis ils sont refroidis sous l'eau de robinet à 20°C. L'absorbance est mesurée à 485nm puis on trace la courbe d'étalonnage (voir résultats en Annexe V.2).

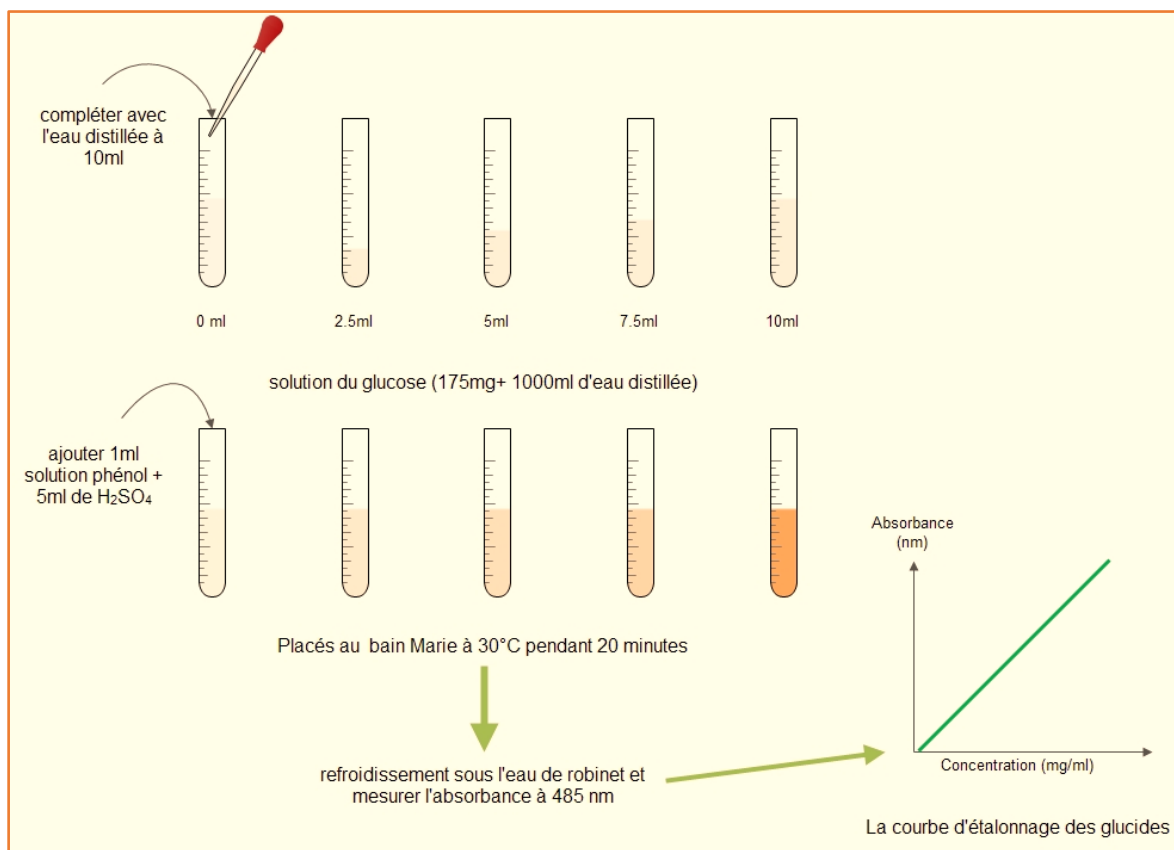


Figure 15 : Méthode de traçage de la courbe d'étalonnage des glucides.

2. Protocole expérimental

Préparer une solution à 0.2% (m/v) de la poudre de microalgue dans de l'eau distillée. 2ml de la solution à doser sont mis dans un tube à essai avec 1ml de phénol (à 5% dans l'eau). 5ml de 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. Les tubes sont placés au bain Marie à 30°C pendant 20 minutes puis refroidis sous l'eau à 20°C. L'absorbance est mesurée à 485nm. Les teneurs sont déterminées en référence à une gamme étalon de glucose.

II.2.3. 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:

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 1L 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 10 minutes puis 0.25ml de réactif D est ajouté. Bien mélanger. Laisser la coloration se développe pendant 20-30 minutes à l'obscurité. Lire l'absorbance à 685nm (voir résultats en Annexe V.3).

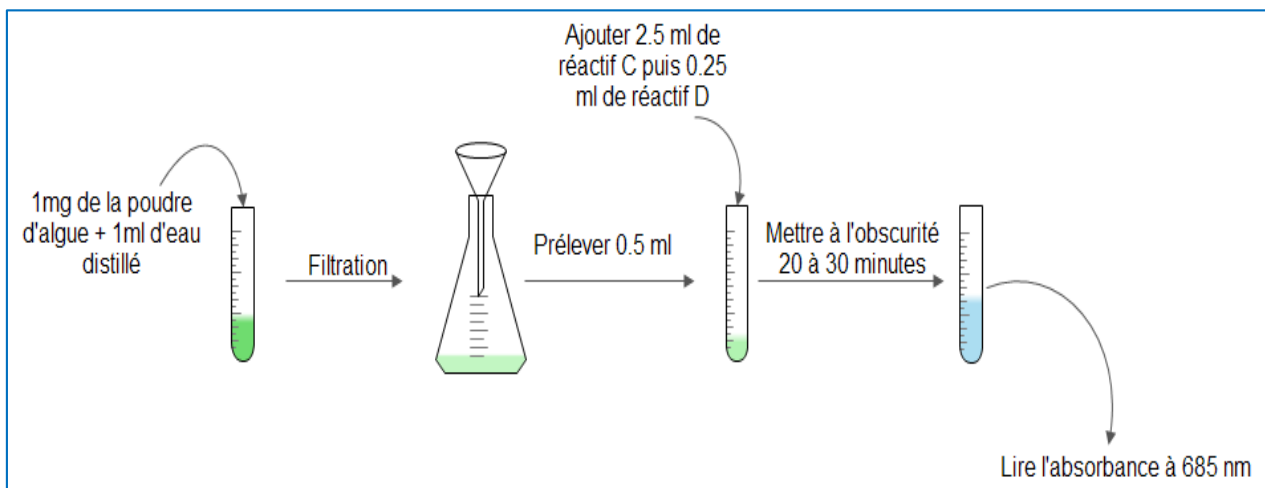


Figure 16 : Les étapes de dosage des protéines.

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

$$\text{Concentration des protéines (mg/l)} = \text{DO}_{685\text{nm}} / 0.23$$

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

II.3. Elevage d'Artémia :

II.3.1. Incubation des cystes :

L'obtention de nauplii se fait par hydratation des œufs de résistance (cystes dormants) disponibles au laboratoire des écosystèmes aquatiques du CNRDPA, cette opération a été abordée après avoir effectué les étapes suivantes :

- Préparation et nettoyage de bouteille de Zoug par le formol dilué.
- Filtration de l'eau de mer en utilisant une pompe et un filtre de 0.22 µm de diamètre pour éliminer les déchets, les bactéries et les microalgues.
- Analyse de l'eau de mer : un appareil multi-paramètres nous a servi à mesurer la salinité et le pH.
- Une quantité de 16g de cystes d'artémia a été introduite dans une bouteille de Zoug contenant 8 litres d'eau de mer (concentration utilisée (2g de cystes/l)).
- Selon **Person- Le Ruyet, (1975)** les conditions d'incubation des cystes sont les suivantes :
 - **Température** : 26°C.
 - **Salinité** : 36‰
 - **pH** : 7.8
 - **Bullage** (O₂)
 - **Intensité lumineuse** : 2000 lux mesuré avec un lux mètre.
 - **Durée d'incubation** : 24h.

II.3.2. Calcul du taux d'éclosion des cystes :

Deux heures après l'incubation des cystes le taux d'éclosion est calculé en suivant les étapes suivantes (**Madani et Milla, 2001**) :

- 05 échantillons des cystes sont prélevés à l'aide d'une micro pipette de 250 µl ;
- On compte le nombre total des cystes sous une loupe binoculaire ;
- La moyenne des cystes (**C**) est calculée ;
- Les cystes de chaque échantillons sont placés dans des boites de Pétri contenant de l'eau de mer suffisamment aérée ;
- Les cystes sont incubés pendant 48h ;
- Après l'incubation les nauplii d'artémia sont anesthésiés par des gouttes de Chloroforme ;
- On compte le nombre de nauplii sous la loupe binoculaire ;
- La moyenne des nauplii (**N**) est calculée.

Taux d'éclosion est déterminé par la formule suivante (Madani et Milla, 2001) :

$$\text{Taux d'éclosion} = (N \times 100) / C$$

II.3.3. Récupération des nauplii :

Après 24h et avant la récupération des nauplii, l'aération est stoppé environ 15minutes ce qui a pour but de faire sédimenter d'abord les œufs non éclos, puis les nauplii, avec remontée des coques vides en surface (figure 17.a). Les premiers millilitres, riches en œufs non éclos étant éliminés, la récupération des nauplii se fait sur tamis (figure 17.b). Les larves sont aussitôt diluées dans l'eau de mer et comptées avant d'être utilisées. La récupération des larves se fait donc rapidement et les manipulations sont réduites au minimum.

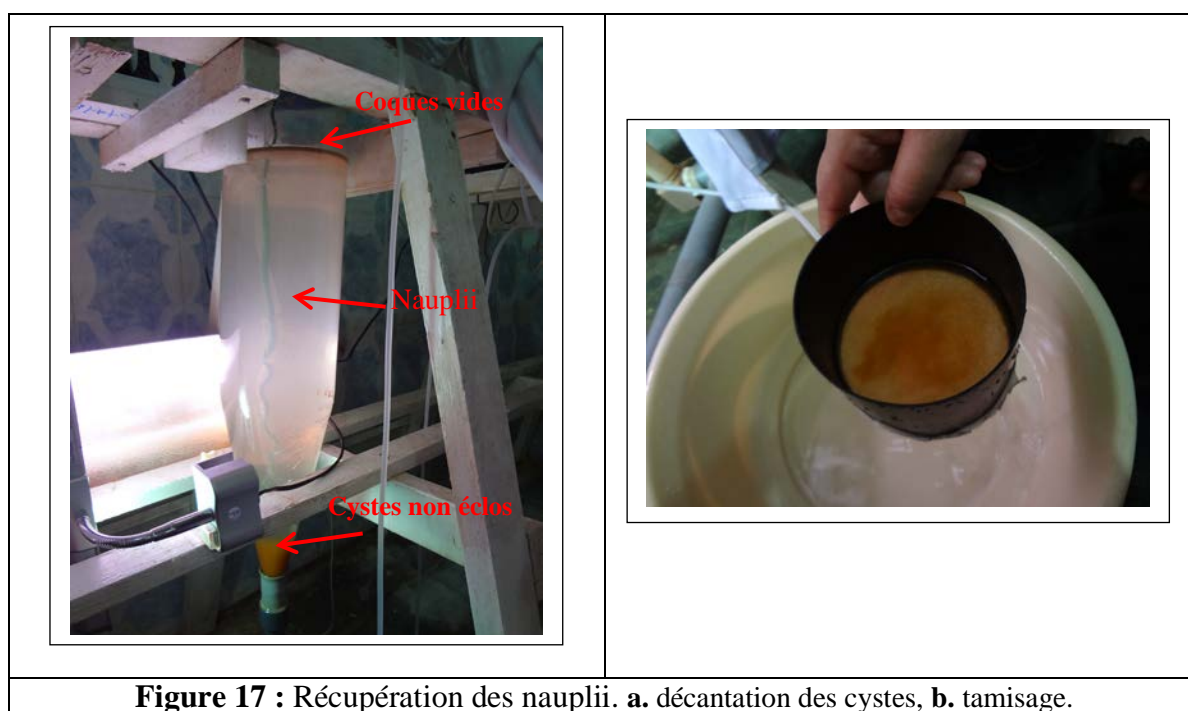


Figure 17 : Récupération des nauplii. a. décantation des cystes, b. tamisage.

II.3.4. Comptage des nauplii :

Avant de procéder à l'élevage, les nauplii ont été redilués dans un récipient de 2 litres d'eau de mer afin de les compter, le comptage se fait comme suit :

Introduire un volume de 1ml d'échantillon contenant un nombre X de nauplii, dans une boîte de Pétri, et ajouter 5 gouttes de Chloroforme qui joue le rôle d'anesthésiant.

En utilisant la loupe binoculaire et à l'aide d'une feuille quadrillée (figure 18.b) on a effectué le comptage des nauplii. L'opération est répétée 10 fois.

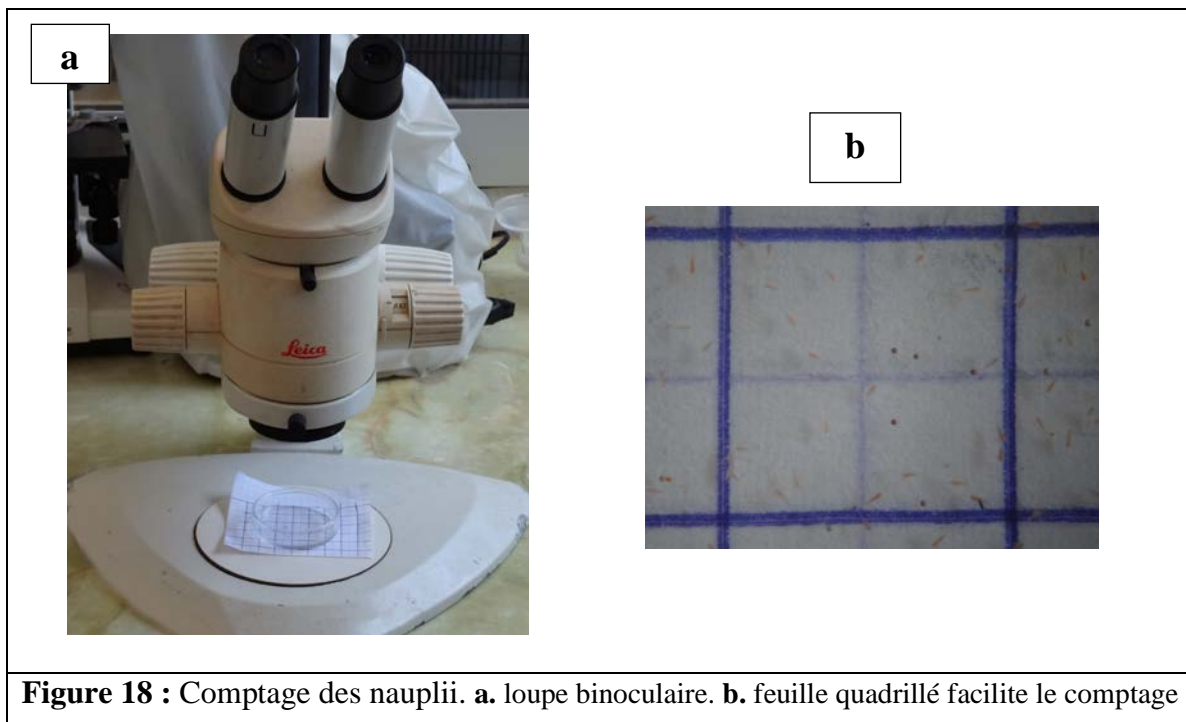


Figure 18 : Comptage des nauplii. **a.** loupe binoculaire. **b.** feuille quadrillé facilite le comptage

Résultats de comptage :

Tableau 02: Comptage du nombre des nauplii.

Prélèvements	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nombre de nauplii/ml	338	251	236	312	310	300	326	274	283	312

$$N = (338 + 251 + 312 + 310 + \dots + 312) / 9$$

$$N = 300.66 \text{ nauplii/ml} \dots \dots \dots (1)$$

Dans la présente étude, la méthode décrite par **Person- Le Ruyet, (1975)** a été adoptée pour l'évaluation de l'essai de nutrition des artémias par une microalgue d'eau douce lyophilisée (*Chlorella* sp) et par la levure boulangère.

Le test a été effectué sur 5 bouteilles de Zoug de 8 litres contenant chacune 20000 nauplii. Ce nombre a été prélevé à partir du récipient de 2 litres précédemment préparé après calcul :

Selon le résultat (1) ; un volume de 1ml contient environ 300 nauplii pour avoir le nombre désiré (20000 N), il suffit de diviser ce nombre par 300 N pour obtenir le volume (V) qui convient.

$$\text{Donc : } V = 20000 / 300 = 66.66 \text{ ml} \approx 67\text{ml}$$

Par ailleurs ; prélever un volume de 67ml (=20000 N) du récipient et verser le dans les bouteilles de Zoug contenant en premier lieu 2 litres d'eau de mer filtrée.

II.3.5. Nutrition des nauplii :

Afin de comparer l'efficacité alimentaire de la microalgue *Chlorella* et de la levure boulangère. Nous avons réalisés 5 essais différents (figure 19), les nauplii sont introduit dans des bouteilles de Zoug et alimentés avec des quantités croissantes de Chlorelle ou de levure boulangère (voir tableau 03).

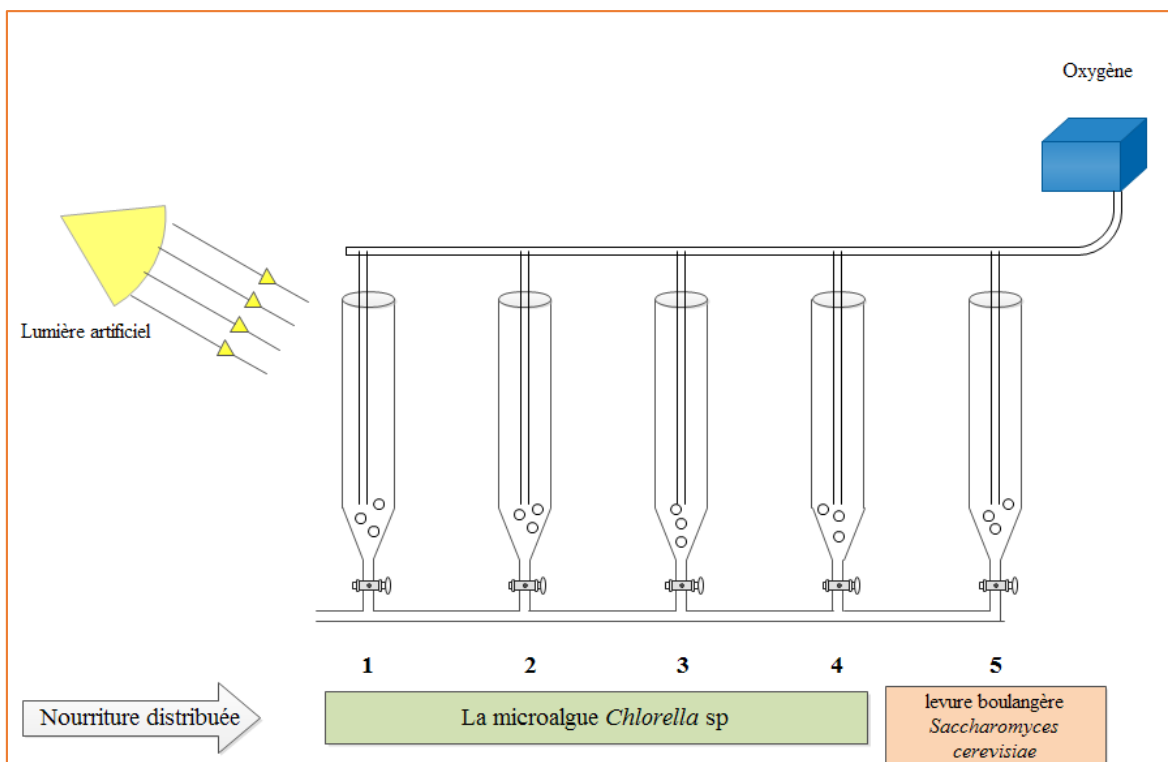


Figure 19 : Schéma représentant l'élevage d'artémia dans les bouteilles de Zoug.

Tableau 03 : Quantités de nourriture distribuée en fonction du temps.

		<i>Chlorella sp</i>				Levure
		1	2	3	4	5
Quantité de nourriture distribuée (mg)	N° Bouteilles					
	2 ^{ème} jour	150	200	250	300	300
	4 ^{ème} jour	300	350	400	450	450
	6 ^{ème} jour	450	500	550	600	600
	8 ^{ème} jour	600	650	700	750	750

- Toutes les expériences débutent par des nauplii de 0.5mm.
- Chaque deux jours et avant de donner l'aliment aux artémias, un prélèvement de 10 individus de nauplii a été effectué à partir de chaque bouteille pour mesurer la taille.
- Un suivi de la croissance a été réalisé sous le microscope optique et/ou sous la loupe binoculaire.

3^{ème} chapitre :

Résultats et discussions

I. Résultats de la culture de la microalgue *Chlorella* sp :

I.1. Cinétique de croissance de l'espèce *Chlorella* sp cultivée en BBM :

La courbe de croissance de *Chlorella* sp est constituée essentiellement de 3 phases (figure 20) :

La première phase dure 10 jours appelée phase d'adaptation durant laquelle une faible augmentation en nombre de cellules s'est produite (figure 20), cela montre que les cellules de *Chlorella* s'adapte pas rapidement au milieu de culture. La deuxième phase débute du 10^{ème} au 22^{ème} jour, durant laquelle nous avons observés que le nombre de cellules est passé de $3,8 \times 10^6$ à $8,05 \times 10^7$ cellules/ml. Cette phase a été définie comme phase exponentielle. Durant cette phase les cellules se divisent et consomment les nutriments du milieu de culture. La dernière phase définie comme stationnaire, débute le 24^{ème} jour où il a été observé une variation minime du nombre de cellules due à la diminution des nutriments dans le milieu de culture et / ou à la production de déchets toxiques.

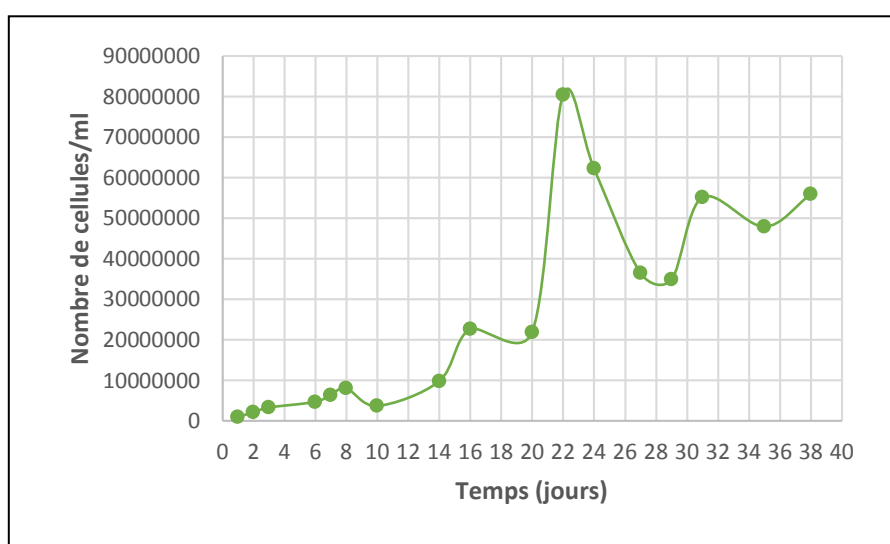


Figure 20 : Nombre de cellules de *Chlorella* sp cultivée en BBM.

I.2. Détermination du taux de croissance spécifique :

Tableau 04 : Résultats de calcul du taux de croissance de *Chlorella*.

Espèce	μ (j^{-1})	K (division/ jour)	T_t (jour)
<i>Chlorella</i> sp	1.51	2.19	0.46

Nous avons observés que le taux de croissance de notre culture de *Chlorella* sp est de 1.51 j⁻¹ soit 2.19 division par jour. Ce taux est plus important que ceux obtenus pour la croissance de *Chlorella vulgaris* ($\mu= 1.2 \text{ j}^{-1}$) en hétérototrophie rapporté par **Martinez et Orus., (1991)** et de *Chlorella pyrenoidasa* ($\mu= 0.99 \text{ j}^{-1}$) constaté par **Tang et al., (2011)**.

II. Résultats des analyses biochimiques :

Les analyses biochimiques de la poudre de la microalgue séchée (*Chlorella* sp) et de la levure boulangère (*Saccharomyces cerevisiae*) sont répertoriées dans le tableau suivant :

Tableau 05 : Résultats des analyses biochimiques de *Chlorella* sp et *Saccharomyces cerevisiae*.

	Lipides		Protéines		Glucides	
	Extrait de lipide (g)	Rendement (%)	Quantité de protéines (mg/l)	Rendement (%)	Quantité de glucides (mg/l)	Rendement (%)
<i>Chlorella</i> sp	0.24	24	0.52	52	325.46	16.27
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.26	26	0.40	40	388.26	19.14

II.1. Comparaison de la composition biochimique de la microalgue *Chlorella* sp :

En comparant les résultats (tableau 06) de nos analyses à ceux de **Feinberg (1984)**, ils montrent que la microalgue, cultivée sur le milieu Bold Basal (BBM), est plus riche en lipides, en glucides et en protéines que celle analysée par cet auteur.

Tableau 06 : Résultats de la composition biochimique de *Chlorella* sp.

Auteurs	Espèces	Lipides %	Protéines %	Glucides %
Feinberg, 1984	<i>Chlorella</i> sp	20,7	45,9	9,7
Nos résultats	<i>Chlorella</i> sp	24	52	16.10

II.2. Comparaison de la composition biochimique de la levure *Saccharomyces cerevisiae* :

Tableau 07 : Résultats de la composition biochimique de *Saccharomyces cerevisiae*.

Auteurs	Espèces	Lipides %	Protéines %	Glucides %
Coutteau et al., 1992	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18-28	40	35
Nos résultats	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26	40.30	19.14

La comparaison de la composition en protéines, en lipides et en glucides de *Saccharomyces cerevisiae* analysée par rapport à celle utilisée par **Coutteau, (1992)**, laisse apparaitre que notre levure se caractérise par des taux en protéine (40,30%) et en lipides (26%) plus élevés et une teneur en glucides (19,14%) plus faible que celle utilisée par cet auteur dont les valeurs sont respectivement de 40%, 18-28% et 35%.

II.3. Comparaison entre la composition biochimique de la microalgue *Chlorella* sp et la levure *Saccharomyces cerevisiae* :

Tableau 08 : Résultats de la composition biochimique de *Chlorella* sp et *saccharomyces cerevisiae*.

Espèces	Lipides %	Protéines %	Glucides %
<i>Chlorella</i> sp	24	52	16.27
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26	40.30	19.14

La confrontation des résultats des analyses de la *Chlorella* et de *Saccharomyces cerevisiae* indiquent que :

- ✓ *Chlorella* sp se distingue par une valeur très élevée en protéines de (52%), cette quantité est supérieure à celle de la levure (40.30%),
- ✓ Que le taux des lipides sont assez proches : 24 % pour *Chlorella* sp et 26% pour *Saccharomyces cerevisiae*,
- ✓ La levure se caractérise par une teneur plus élevée en glucides (19,14%) contre 16,27% pour la microalgue.

III. Elevage de l'Artémia :

III.1. Suivi de l'éclosion des cystes :

Avant 24h, le suivi de l'éclosion des cystes au microscope optique a permis d'obtenir les photographies suivantes (figure 21) :

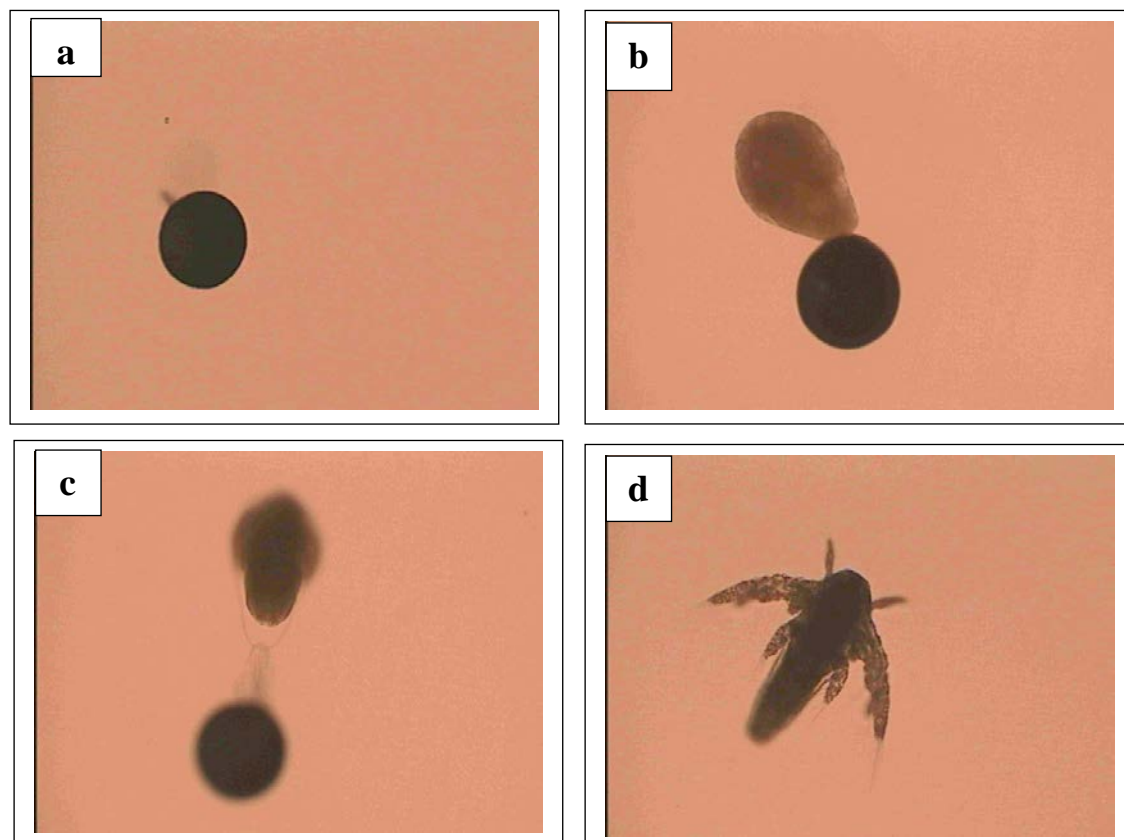


Figure 21 : Etapes d'éclosion des cystes d'Artémia observées au grossissement **GX40**.
a. cyste d'artémia plein. **b.** pré-nauplius (stade 1). **c.** pré- nauplius (stade 2). **d.** nauplius
 fraîchement éclos (stade I).

Le temps d'incubation des œufs (cystes) est de 24 à 72 h, les œufs n'éclosent pas tous en même temps. L'embryon reste attaché à son œuf pendant 5 à 6 heures (figure 21.a). Notre résultat est conforme à celui obtenu par **Treece, (2000)**.

Placés 20 heures dans l'eau de mer à 26°C, les pré-nauplius (stade 1) apparaissent (figure 21.b). Pendant les premières heures, l'embryon se bloque sous la coque de cyste dans ce qu'on appelle la phase de parapluie.

L'Artémia nouvellement éclos s'appuie sur la membrane de son sac jaune pour puiser les éléments nutritifs parce que sa bouche et son anus ne sont pas pleinement développés. Après le pré-nauplius (stade 2) (figure 21.c) est transformé en nauplius

(stade I). Il nage librement (figure 21.d) (Lavens et al., 1996). A ce stade, il est orange brunâtre à cause de ses réserves de jaune et muni de trois paires d'appendices. Il utilise ses antennes spécialement modifiés pour la locomotion et plus tard pour le filtrage des produits alimentaires (Hoff et al., 2001).

Après l'éclosion, le nauplius mue une deuxième fois en stade larvaire (stade II) et commence à s'alimenter avec la microalgue (*Chlorella* sp) ou la levure (*Saccharomyces cerevisiae*).

III.2. Taux d'éclosion des cystes d'artémia :

Le taux d'éclosion dépend de la marque d'œufs utilisée, de la localisation, de la race géographique et la qualité des œufs (Sorgeloos et Persoone, 1975). D'après les résultats indiqués dans le tableau 09, le taux d'éclosion de l'Artémia est de 81.53%. Ce taux est supérieur à celui des cystes Utah (USA) et qui est entre 70 à 75%. Il est cependant inférieur à celui des cystes de California qui est de 90% (Sorgeloos, 1973).

Person-Le Ruyet (1975) rapporte que l'Artémia de San Francisco atteint un taux d'éclosion de 85%.

Tableau 09 : Résultats de comptage de nombre des cystes et nauplii.

N° échantillons	1	2	3	4	5	Moyenne
Nombre des cystes totales	519	148	145	243	169	199.6
Nombre de nauplii	423	126	127	210	112	244.8

$$(N_m / C_m) \times 100 = (199.6 / 244.8) \times 100$$

$$\text{Taux d'éclosion} = 81.53\%.$$

III.3. Suivi de la croissance des nauplii :

Dans le but de réduire au minimum les manipulations, les prélèvements ont été effectués régulièrement, tous les 2 jours. Un nombre précis de (10) individu a été prélevé de chaque bouteille.

Les artémias contenus dans les bouteilles (1, 2, 3, 4) sont alimentés par quantités croissantes de microalgue lyophilisée *Chlorella* sp. Cependant ceux contenus dans la bouteille 5 sont nourris par la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Les résultats obtenus de différentes quantités de nourriture distribuées sont représentés dans le tableau 10 et les histogrammes des figures (22, 23, 24, 25) :

Tableau 10 : Résultats des tailles moyennes obtenus à partir de différentes quantités de nourriture distribuées chaque 2 jours.

	Aliments	<i>Chlorella</i> sp				Levure
	N° bouteille	1	2	3	4	5
2 ^{ème} jour	Nourriture distribuée (mg)	150	200	250	300	300
	Taille moyenne (mm)	1.18±0.11	1.04±0.13	1.08±0.12	1.07±0.17	1.27±0.12
4 ^{ème} jour	Nourriture distribuée (mg)	300	350	400	450	450
	Taille moyenne (mm)	1.60±0.27	1.88±0.25	1.55±0.12	1.18±0.19	2.08±0.20
6 ^{ème} jour	Nourriture distribuée (mg)	450	500	550	600	600
	Taille moyenne (mm)	Mortalités	Mortalités	1.82±0.21	1.41±0.11	3.05±0.60
8 ^{ème} jour	Nourriture distribuée (mg)	600	650	700	750	750
	Taille moyenne (mm)	Mortalités	Mortalités	3.63±0.37	1.73±0.53	6.94±1.57

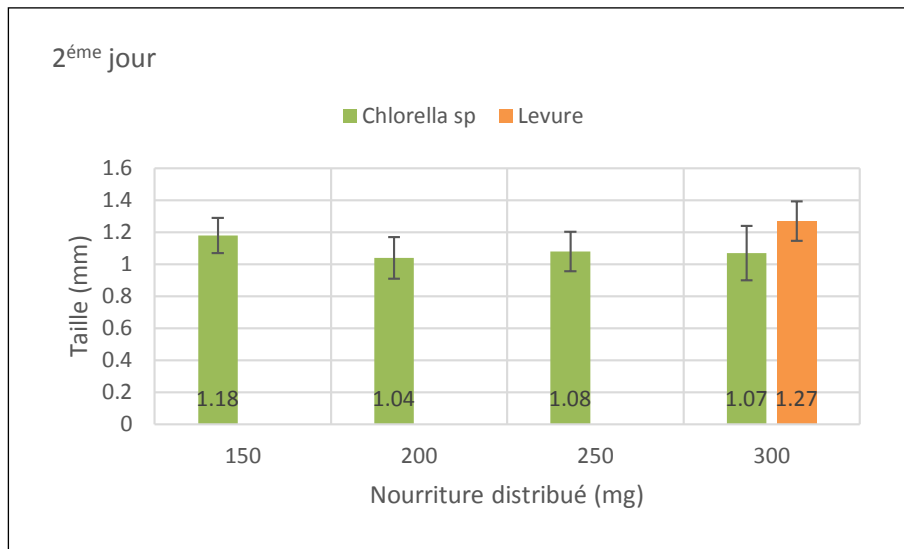


Figure 22 : Taille moyenne des larves d'Artémia au 2^{ème} jour, en fonction de la quantité de nourriture distribuée.

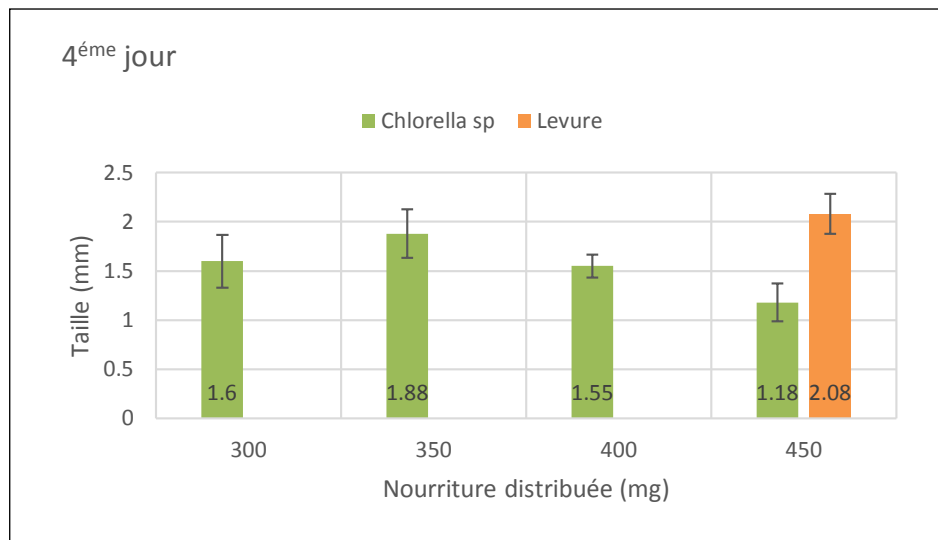


Figure 23 : Taille moyenne des larves d'Artémia au 4^{ème} jours, en fonction de la quantité de nourriture distribuée.

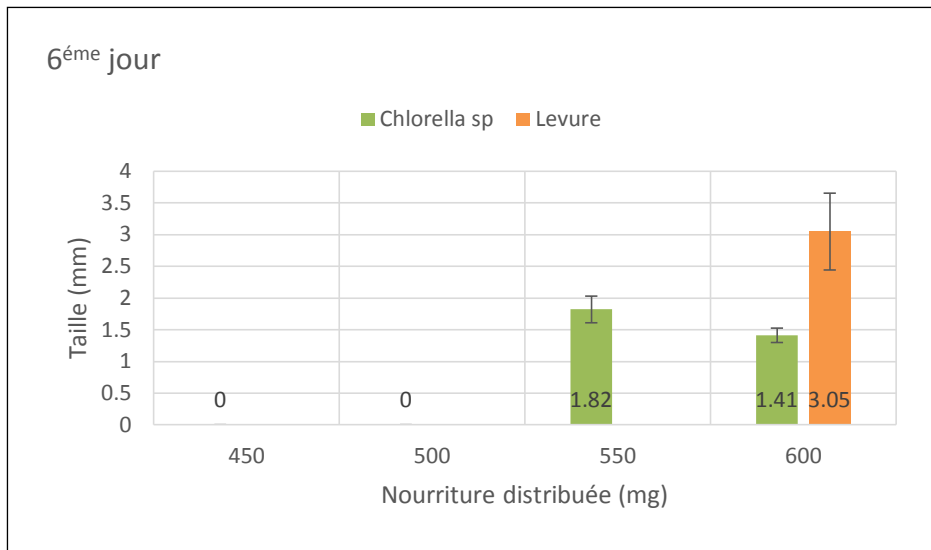


Figure 24 : Taille moyenne des larves d'Artémia au 6^{ème} jours, en fonction de la quantité de nourriture distribuée.

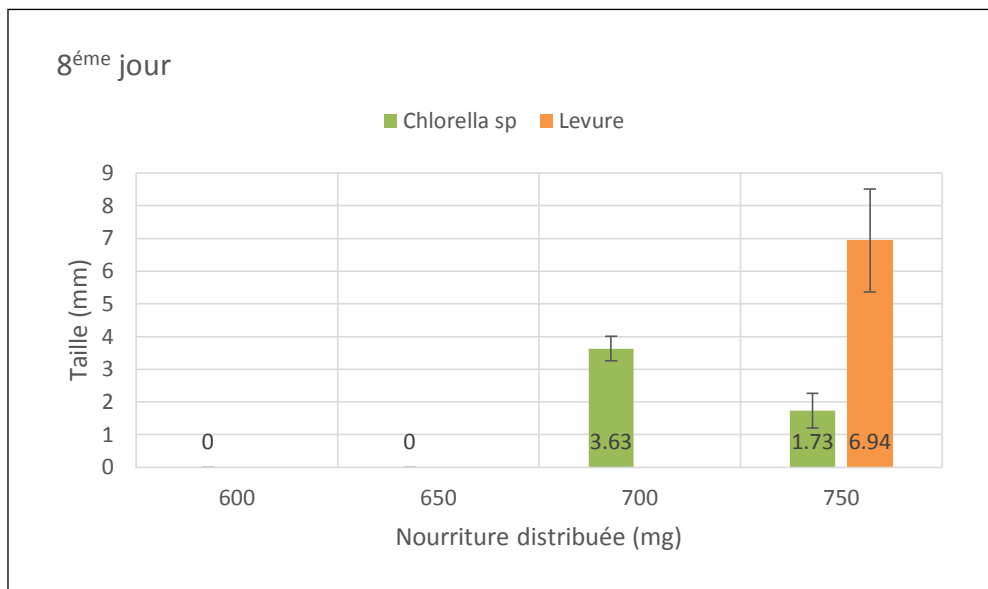


Figure 25 : Taille moyenne des larves d'Artémia au 8^{ème} jours, en fonction de la quantité de nourriture distribuée.

L'examen de tableau (10) et des figures (22, 23, 24, 25) montre :

✓ Qu'au 2^{ème} jour, la taille des larves alimentée par la levure est en moyenne légèrement supérieure à celle obtenues par *Chlorella* dans les quatre bouteilles.

✓ Que les différences entre les tailles moyennes des larves obtenues par *Chlorella* lyophilisée s'accroissent au 4^{ème} jour néanmoins l'efficacité alimentaire de la levure reste la meilleure source de nourriture pour la croissance des larves au 4^{ème} jour avec une taille maximale de 2.08 ± 0.20 mm.

✓ Que des cas de mortalité des artémias sont enregistrés dans les bouteilles 1 et 2 au 6^{ème} jour ceci est probablement due à l'insuffisance de la quantité d'aliment à cause d'une mauvaise dissolution de la poudre d'algues dans l'eau. L'algue non dissoute sédimente au fond de la bouteille.

Les larves de la bouteille 3 sont restées en bon état. Cependant, la taille moyenne est toujours inférieure à celle obtenue par la levure.

En comparant nos résultats à ceux obtenus par **Person-Le Ruyet (1975)** sur une microalgue *Tetraselmis* lyophilisée, qui a permis aux artémia d'atteindre une taille de 3.5 mm en 6 jours et sur *Scenedesmus* qui atteint la longueur de 2.8 mm en moyenne. On peut dire que nos résultats sont moins satisfaisantes jusqu'au 6^{ème} jour.

La plus grande quantité de *Chlorella* distribuée dans la bouteille 4 a donné une mauvaise croissance étant donné que les tailles moyennes d'artémia déterminées sont inférieures aux celles obtenues par la bouteille 3 et par la levure

✓ Au 8^{ème} jour, une nette croissance des larves dans les bouteilles (3, 5) est enregistrée. Les tailles moyennes des larves ont doublé. Cet accroissement de la taille des larves d'artémia s'expliquerait par une meilleure assimilation d'aliment. Cependant la taille des larves de la bouteille 4 reste presque constante ceci est expliqué par une mauvaise survie de l'artémia due à une sursaturation du milieu par la poudre de chlorelle.

✚ Comparaison des mêmes quantités de nourriture distribuée entre la microalgue *Chlorella* sp et la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Tableau 11 : Comparaison entre les tailles moyennes des larves d'artémias alimentés par *Chlorella* et la levure.

Nourriture distribuée (mg)	300	450	600	750
Taille (mm)				
Taille (mm) d'artémia nourri par <i>Chlorella</i> sp	1.07	1.18	1.41	1.73
Taille (mm) d'artémia nourri par <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	1.27	2.08	3.05	6.94

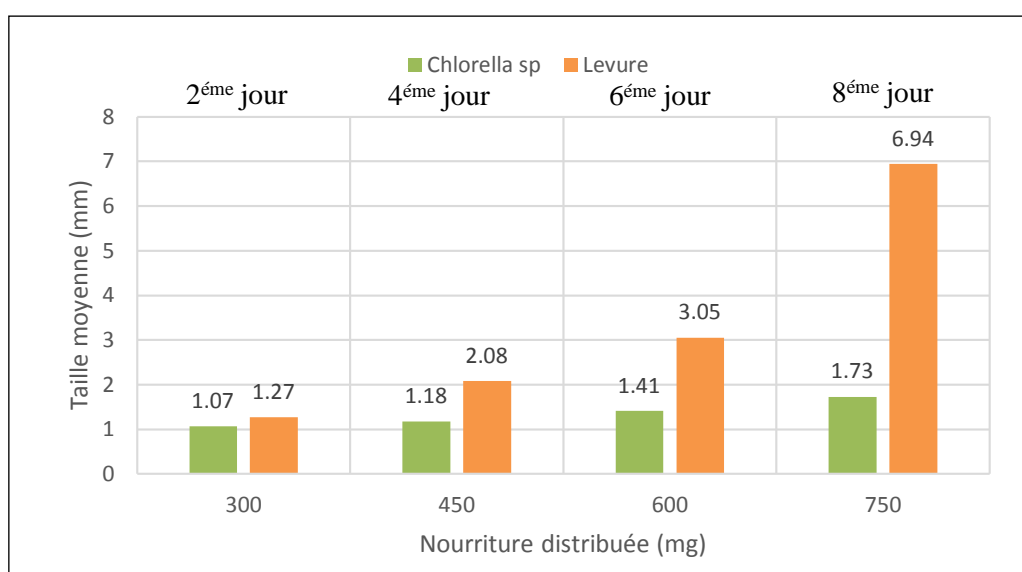


Figure 26 : Comparaison des tailles moyennes des larves d'Artémia aux 2, 4, 6 et 8 jours, en fonction de la même quantité de nourriture distribuée.

En comparant les tailles (à différents temps) des artémias alimentés par *Chlorella* et *Saccharomyces* quand ils reçoivent les mêmes quantités de nourriture, nous pouvons déduire que la levure permet une meilleure croissance.

Au 8^{ème} jour nous constatons une mortalité des artémias nourris par *Chlorella*. Ceci est peut être dû à la grande quantité de la poudre d'algue distribuée ce qui a provoqué un phénomène d'asphyxie sur les larves d'artémias.

∞ La différence entre les nauplii alimentés par la microalgue et la levure :

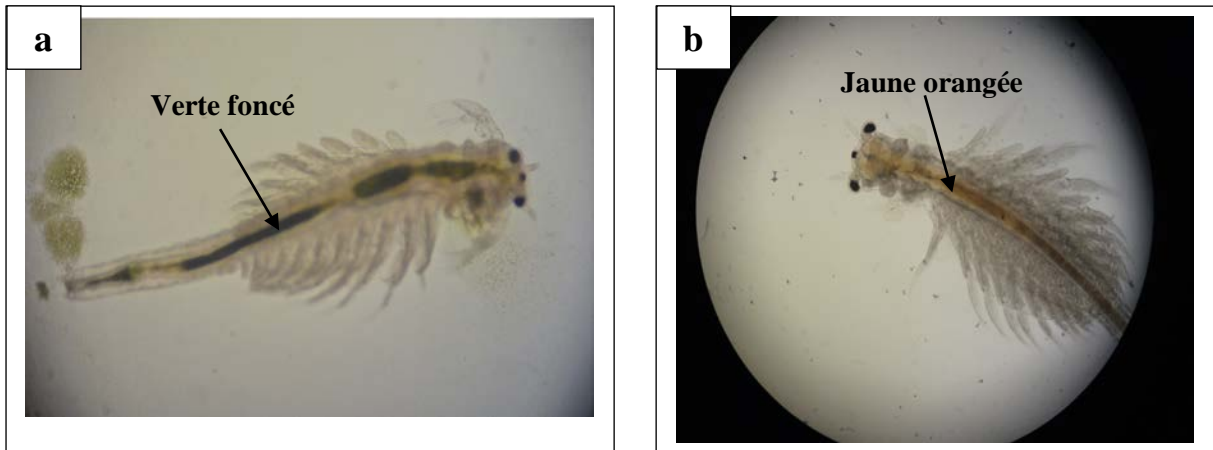


Figure 27 : Différence de couleur d'artémia alimenté par la microalgue (*Chlorella* sp) et la levure (*Saccharomyce cerevisiae*) observée au microscope optique au grossissement **GX 100**. **a.** Artémia alimenté par *Chlorella* sp. **b.** Artémia alimenté par la levure.

∞ La reproduction d'Artémia :

Les larves nourries par la levure ont été transvasées dans un aquarium pour mieux suivre la croissance jusqu'au stade de maturité.

Les résultats obtenus montrent que ce stade est atteint à partir du 10^{ème} jour d'élevage, où on a pu distinguer le sexe. La taille maximale a atteint 15mm pour la femelle et 12mm pour le mâle (voir figure28).

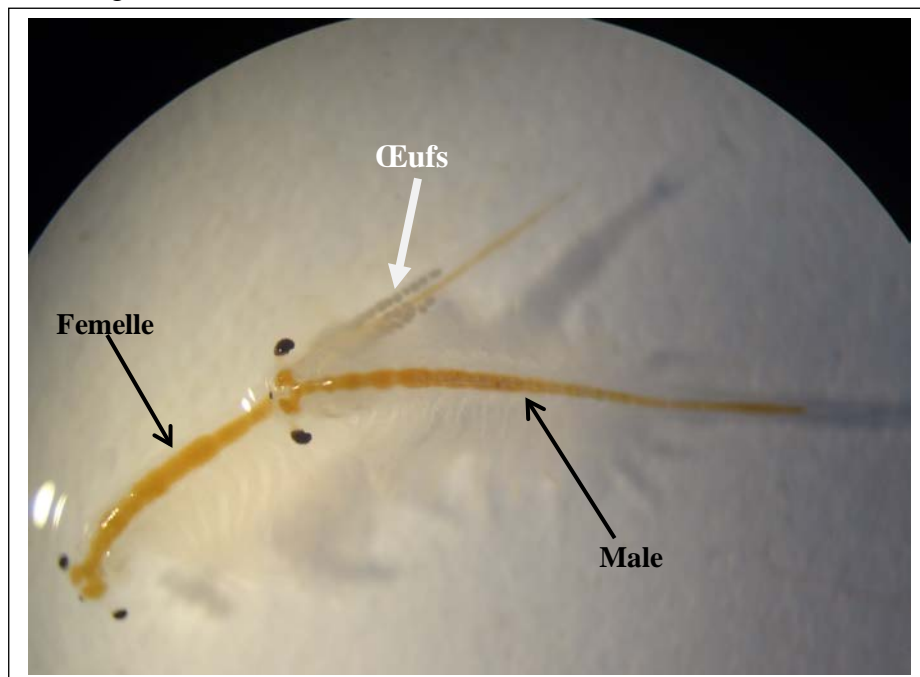


Figure 28 : La reproduction sexuée d'Artémia observé sous la loupe binoculaire.

Conclusion

Le présent travail a porté sur la culture de la microalgue *Chlorella* sp, l'analyse biochimique de *Chlorella* sp et la levure boulangère (*Saccharomyces cerevisiae*) et enfin l'enrichissement d'artémia par *Chlorella* lyophilisée et levure boulangère (*Saccharomyces cerevisiae*).

L'étude a prouvé que la composition du milieu de culture BBM favorise parfaitement la croissance de la microalgue *Chlorella* sp cela est justifié par le taux de croissance spécifique parvenu ($\mu = 1.51 \text{ j}^{-1}$). La teneur de la levure boulangère en molécules bioactives y compris lipides et glucides est importante que celle obtenus par *Chlorella* sp.

Les résultats de l'enrichissement d'artémia obtenus montrent qu'aux différentes quantités de nourriture de levure boulangère la taille des larves atteint 6.94 mm, alors que *Chlorella* lyophilisée a produit des larves d'une taille moins importante 1.73 mm en raison de la sédimentation de l'algue causée par une mauvaise dissolution de la poudre dans l'eau de mer.

Les larves nourris par la levure boulangère ont atteint des tailles maximales de 15 mm pour les femelles et de 12 mm pour les males avec un ratio plus élevé de copulation après 10 jours. De ce fait on peut conclure que la qualité et la quantité de nourriture influencent fortement sur la croissance et la survie des nauplii d'Artémia.

Notons enfin qu'il serait avantageux :

- D'effectuer des analyses biochimiques sur l'Artémia lyophilisée afin de déterminer sa valeur nutritionnelle.
- D'exploiter l'Artémia produite vivante ou congelé comme aliment pour les larves de poissons et les crustacés en élevage.
- D'appliquer un aliment composé de mélange microalgue-levure pour la nutrition d'Artémia afin d'obtenir une bonne croissance dans un peu de temps.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Barnabé G., 1989. Aquaculture (volume1). Ed Lavoisier : p 241- 259.

Becerra Celis Giuliana Patricia., 2009. Proposition de stratégies de commande pour la culture de microalgues dans un photobioreacteur continu. Thèse de doctorat. Paris, p 218-219.

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.

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

Coutteau Peter., Brendonck Luc., Lavens Patrick et Sorgeloos Patrick., 1992. The use of manipulated baker's yeast as an algal substitute for the laboratory culture of Anostraca. Kluwer Academic in Belgium. Hydrobiologia 234: 25-32.

Criel R. J., Macrae H. T., 2002. "Artemia morphology and structure". In T. J. Abatzopoulos, J. A. Breardmore, J. S. Clegg & P. Sorgerloos. *Artemia: Basic and Applied Biology*. Kluwer Academic Publishers. p 1–33.

Dev Goswami 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.

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.

Dumitrascu Mioara., 2011. Artemia salina. Balneo-Research Journal Vol.2, Nr.4, 2011.SC Biosafety SRL-D. p119- 122.

Feinberg Daniel A., 1984. Fuel options from microalgae representative chemical compositions. United States of America: p 13.

Ferra Christiane., 2008. Aquaculture. Vuibert, France: p364 -371.

Folch J., Lees M., Sloane Stanley Gh., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957 May; 226(1):497-509.

Fox Richard., 2006. Invertebrates anatomy online artémia franciscana. Lander University.

Herbland A., 2007. La culture du phytoplancton dans les bassins aquacoles Aspects théoriques et applications pratiques. Ifremer –Département Aquaculture en Calédonie : p 4-7.

Herskowitz I., 1988. Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 52: p536-553.

Hickman Cleveland P., 1967. *Biology of Invertebrates.* St. Louis, Missouri: C. V. Mosby. p 757.

Hoff F.H., Snell T.W., 2001. *Plankton culture manual.* 5^{ème} édition. Florida Aqua Farms, Inc. USA. p 95-106.

James C. M., Makkeya B. A., 1981. Production of rotifers, *Brachionus plicatilis*, brine shrimp, *Artemia salina* and copepods for aquaculture. Annual research report 1981, Kuwait Institute for Scientific Research: 103-107.

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.

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 79-195.

Léger P., Bengtson David. A., Sorgeloos P., Simpson Kenneth L., and Beck Allan D., 1987. The nutritional value of *Artemia*: a review. Universa press, Wetteren, Belgium. P358- 372.

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.

Madani L., Milla T., 2001. Manuel pratique sur l'*Artémia*. Centre National de la Recherche et de Développement de l'aquaculture et de la pêche (CNRDPA), p 15.

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

Martinez F., Orus M.I., 1991. Interactions between glucose and inorganic carbon metabolism in *Chlorella vulgaris* strain UAM101. *In* Richmond A., 2004. *Handbook of Microalgal culture- Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell science Ltd. Oxford, UK. 566p.

Muller-Feuga A., 2000. The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *J. Appl. Phycol.*, 12, 527–534.

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

Person- Le Ruyet J., 1975. Techniques d'élevage en masse d'un rotifère (*Brachionus plicatilis* Müller) et d'un crustacé Branchiopode (*Artémia salina* L.). Ostend, Belgium, Vol. 1:331-343.

Prescott Lansing M., Harley John P., Klein Donald A., Sharwood., Woolverton., 2010. *Microbiologie*. Editions de Boeck université, Bruxelles. Belgique: p629 - 639.

Reviere B., 2002. *Biologie et phylogénie des algues*. Tome1. Col. Belin Sup Science. Paris : p 275.

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

Roland J.C., El Maarouf-Bouteau H., Bouteau F., 2008. *Atlas biologie végétale – organisation des plantes sans fleurs, algues et champignon*. 7^{ème} ed, Dunod. Paris, p 16.

Sorgeloos P., Lavens P., Leger et Tackaert W., 1993. The use of Artemia in marine fish larviculture. TML Conference Proceeding 3:73-86.

Sorgeloos P., 1973. First report on the triggering effect of light on the hatching mechanism of Artemia salina dry cysts. Mar. Biol., 22: 75-76.

Sorgeloos P., Persoone G., 1975. Technological improvements for the cultivation of invertebrates as food for fishes and crustaceans.II. hatching and culturing of brine shrimp, *Artemia Salina* L. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam - Printed in The Netherlands. Aquaculture, 6 (1975) 303-317.

Spolaore Pauline., Joannis-Cassan Claire., Duran Elie., and Arsène Isambert., 2006. Commercial Applications of Microalgae. JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING, the Society for Biotechnology, Japan.Vol. 101, No. 2, 87–96.

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.

Talloon M., 1978. The use of locally available food for the mass-culture of the brine shrimp Artemia salina. Bulletin of the Jepara Brackishwater Aquaculture Development Center.

Tang D., Han W., Li P., Miao X., Zhong J., 2011. CO₂ biofixation and fatty acid composition of Scenedesmus obliquus and chlorella pyrenoidosa in response to different CO₂ levels. In Clement- Laroisier B., 2010. Etude de la croissance de *Chlorella vulgaris* en photobioréacteur batch et continu, en présence de concentrations élevées de CO₂. Thèse de doctorat spécialité : science pour l'ingénieur. Fac de paris.

Vos J., de la Rosa Nympha L., 1980. Manual on Artemia production in salt ponds in the Philippines. FAO.

Site d'internet:

Baker A.L. et *al.*, 2012 :

http://cfb.unh.edu/phycokey/Choices/Chlorophyceae/unicells/non_flagellated/CHLORELLA/Chlorella_Image_page.htm

Ian Roberts, 2013: <http://news.ifr.ac.uk/2013/07/synthetic-yeast/#!lightbox/0/>

Anonyme 1: <http://learn.genetics.utah.edu/content/gsl/artemia/>

Taxacher Michael, 2012: <http://www.aquatax.de/Lebendfutter/Artemia/>

Treece Granvil D.,

2000: http://www.mblaquaculture.com/content/downloads/articles/SRAC_Artemia_Production.php

Annexes

Annexe I

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

Annexe II

Matériels non biologique :

Appareillage	Verrerie et instrument
Agitateur magnétique	Ampoule à décanter
Autoclave	Barreau magnétique
Bain Marie	Béchers
Balance	Bec benzen
Centrifugeuse de table	Boîtes de Pétri
Hotte	Cellule Malassez
Loupe binoculaire	Coton cardé
Luxmètre	Cuve en quartz
Lyophilisateur	Eprouvettes graduées
Microscope optique équipé	Erlenmeyer (250ml, 1l)
Multi-paramètres	Jerrican de 5l
Pompe à vide	Lame et lamelles
Spectrophotomètre	Papier aluminium
Thermomètre	Papier filtre Whatman 47mm de diamètre
Vortex	Membrane filtrante de 0.22 μ m, de diamètre 47mm.
Bouteille de Zoug	Pincés métalliques
	Pipettes Pasteur
	Portoirs métalliques ou en plastique
	Tamis
	Tube à essai de 20ml

Annexe III

Le milieu de culture Bold basal (Nicholes 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 stock (de 1 à 6) ajustée avec l'eau distillé à 1000ml.
- Ajouter 1 ml de solutions 7 à 10.
- Autoclavage à 120°C pendant 15 minutes.

Annexe IV

Comptage cellulaire par microscopie à l'aide d'une cellule Malassez (Beccerra Celis, 2009):

Le principe de la méthode consiste à effectuer un dénombrement des cellules microalgales présentes dans un volume connu et dans les limites des carrés de la cellule de comptage à l'aide d'un microscope optique. La cellule de Malassez comporte 25 carrés d'un volume de 10^{-5} ml.

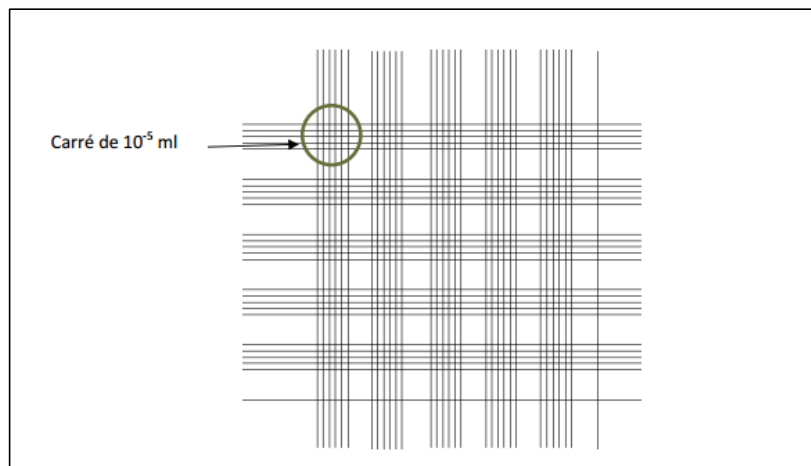


Figure : Cellule de Malassez

Quelques règles simples permettent d'effectuer un comptage de bonne qualité :

- Avant de réaliser le comptage, les cultures doivent être correctement homogénéisées. Une agitation de la culture, juste avant le prélèvement, doit permettre l'obtention d'une culture la plus homogène possible.
- Une dilution doit être réalisée si nécessaire.
- Les carrés nécessaires au dénombrement doivent être choisis de façon aléatoire.
- Pour chaque carré il faut compter :
 - a. tous les éléments situés à l'intérieur des lignes délimitant le carré choisi,
 - b. tous les éléments situés sur les lignes, soit ceux qui sont sur la ligne de gauche et pas ceux qui sont sur la ligne de droite, soit l'inverse
 - c. et, soit ceux qui sont sur la ligne supérieure et pas ceux qui sont sur la ligne inférieure, soit l'inverse.

La concentration cellulaire (cellules/ml) est calculée en utilisant l'équation suivante :

$$N_c = \text{nombre de cellules comptées} / \text{nombre de carrés pris en compte} \times 10^{-5}$$

Annexe V

1. Dosage des lipides :

Extrait de lipide (g) = (ballon + lipide) – ballon vide

Ballon vide = 289.80g

	<i>Chlorella sp</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Ballon + lipide (g)	290.40	290.06
Extrait de lipide (g)	0.24	0.26
Rendement (%)	24	26

2. Dosage des glucides :

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

Tableau : 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	0.59485

La courbe d'étalonnage :

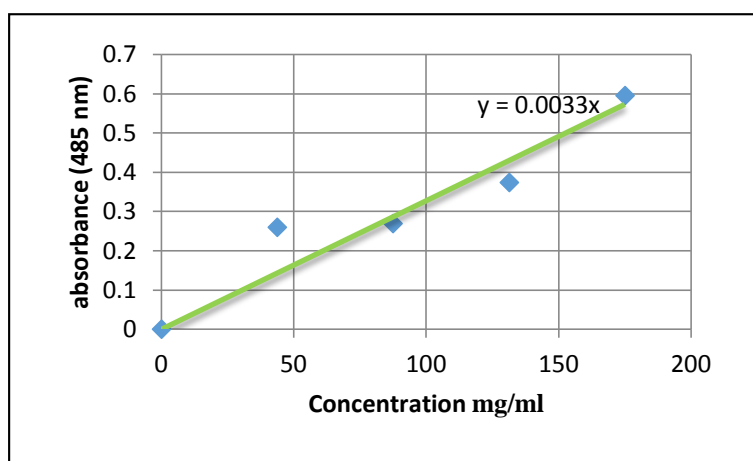


Figure : Courbe d'étalonnage des glucides.

3. Dosage des protéines :

Quantité de protéines (mg/l) = $DO_{685\text{ nm}} / 0.23$

Tableau : Résultats de l'absorbance à 685nm.

Absorbance	Tube 1	Tube 2	Tube 3	Moyenne
<i>Chlorella sp</i>	0.1318	0.1417	0.0853	0.1196
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.0886	0.0976	0.0920	0.0927

Annexe VI

Tableau : les tailles des 10 individus, la taille moyenne et l'écart type au 2^{ème} jour.

Aliments	La microalgue <i>Chlorella</i> sp				Levure boulangère
bouteilles Individu	1	2	3	4	5
1	1.2	1.3	1.15	1.25	1.3
2	1.25	0.95	1.07	0.87	1.24
3	1.1	0.9	1	1	1.35
4	1.05	0.95	1	0.75	1.4
5	1.38	1.1	1.37	1	1.27
6	1.3	1.1	1.15	1.07	1.38
7	1.2	0.95	1.05	1.12	0.98
8	1.1	1.2	0.93	1.07	1.3
9	1.15	1	1.1	1.27	1.15
10	1.05	0.95	1	1.25	1.3
Moyenne	1.18	1.04	1.08	1.07	1.27
Ecart type	0.11	0.13	0.12	0.17	0.12

Tableau : les tailles des 10 individus, la taille moyenne et l'écart type au 4^{ème} jour.

Aliments	la microalgue <i>Chlorella</i> sp				Levure boulangère
bouteilles individu	1	2	3	4	5
1	1.65	2.05	1.6	1.42	2.15
2	1.37	1.7	1.55	1.3	1.95
3	1.45	2.24	1.7	0.97	1.75
4	1.65	1.65	1.45	1.47	2.25
5	2.1	1.64	1.55	1	2.1
6	1.95	2.1	1.4	1.12	2.15
7	1.35	1.75	1.4	1	1.8
8	1.4		1.55	1.35	2.35
9	1.45		1.75	1	2
10			1.52	1.2	2.3
Moyenne	1.60	1.88	1.55	1.18	2.08
Ecart type	0.27	0.25	0.12	0.19	0.20

Tableau : les tailles des 10 individus, la taille moyenne et l'écart type au 6^{ème} jour.

Aliments	La microalgue <i>Chlorella</i> sp				Levure boulangère
Bouteilles individu	1	2	3	4	5
1			2	1.62	3.5
2			1.7	1.37	3
3			1.9	1.37	2.8
4			2	1.25	3.2
5			1.6	1.5	2.2
6			2	1.37	4
7			1.6	1.5	2
8			1.8	1.45	2.5
9			2.1	1.42	2.8
10			1.5	1.25	2.5
Moyenne	Mortalités	Mortalités	1.82	1.41	3.05
Ecart type	0	0	0.21	0.11	0.60

Tableau : les tailles des 10 individus, la taille moyenne et l'écart type au 8^{ème} jour.

Aliments	La microalgue <i>Chlorella</i> sp				Levure boulangère
Bouteilles Individu	1	2	3	4	5
1			3.37	1.62	6
2			4.17	2.05	6.5
3			3.62	0.87	8.12
4			3.75	1.87	6.12
5			3.5	2.25	6.87
6			2.95		5.75
7			3.37		11
8			3.5		6.25
9			4.05		6.62
10			4		6.12
Moyenne	Mortalités	Mortalités	3.63	1.73	6.94
Ecart type	0	0	0.37	0.53	1.57