

الشعبيةالجمهورية الجزائرية الديمقراطية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر وتهيئة الساحل

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



**Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en
Sciences de la Mer Option : Aquaculture**

Thème

**Optimisation de la culture d'une algue halophile pour
la production de biomolécules d'intérêt**

Présenté par

HASNAOUI Dhikra Ichraf

Soutenue le 03/07/2025

Devant la commission du jury suivant

Mr. BITAM A.

Professeur

Président

Mr. AIT SAIDI A.

MCA

Examineur

Mme. BOUKHAROUBA A.

MCA

Promotrice

2024/2025

Remerciements

Avant toute chose, je rends grâce à Dieu, le Tout-Puissant, pour m'avoir accordé la force, la patience et la persévérance nécessaires à la réalisation de ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mon encadrante, Madame **BOUKHAROUBA aya**, pour son accompagnement, ses conseils avisés, sa disponibilité et sa confiance tout au long de ce parcours. Son soutien scientifique et humain ont été déterminant dans l'aboutissement de cette thèse.

Je remercie également Monsieur **AIT SAIDI A.**, pour avoir accepté d'examiner notre travail, ainsi que pour ses remarques pertinentes et constructives, qui ont permis d'enrichir ce mémoire.

Ma reconnaissance va aussi à Professeur **BITAM A.**, président du jury, pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider cette soutenance.

Je n'oublie pas d'adresser mes remerciements à toute ma famille, qui m'a toujours soutenu, encouragé et cru en moi, même dans les moments les plus difficiles. Leur amour et leur patience ont été ma plus grande force.

À mes amis, qui ont partagé avec moi les joies et les épreuves de ce parcours, merci pour votre présence, votre humour et votre amitié sincère.

Je souhaite adresser mes plus chaleureux remerciements à Messieurs Mohamed El Hadi HANNANE et Ayoub HADJAÏSSA pour leur engagement, leur patience et leurs conseils avisés.

Je remercie également toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réussite de ce travail, en particulier le staff administratif, technique et pédagogique de **l'ENSSMAL**, pour leur disponibilité et leur appui tout au long de mon cursus.

À toutes et à tous, merci du fond du cœur.

Dédicace

À mon cher papa, **Mourad**,

Je te dédie ce travail avec tout mon amour et ma reconnaissance. Merci d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir encouragé à donner le meilleur de moi-même et de m'avoir transmis des valeurs de respect, de persévérance et d'honnêteté. Ta présence rassurante, tes conseils avisés et ton soutien inconditionnel m'ont accompagné à chaque étape de ce parcours. Je suis fier d'être ta fille et de pouvoir partager avec toi cette réussite.

À ma merveilleuse maman, **Hanna**,

Tu es le pilier de ma vie, celle qui a su me soutenir dans les moments de doute, qui a su me reconforter dans les moments de tristesse, et qui a partagé avec moi chaque instant de bonheur. Ta patience, ta tendresse et ton amour inconditionnel m'ont permis d'avancer, de croire en moi et de ne jamais abandonner. Merci pour tes prières, tes encouragements et ta confiance. Je te dois tout, maman.

À mon frère, **Achref**,

Ta présence à mes côtés a toujours été une source de force et de réconfort. Merci pour ta générosité, ta complicité et ton humour qui ont su alléger les moments difficiles. Tu es bien plus qu'un frère, tu es un véritable ami, un confident, un allié fidèle sur qui je peux toujours compter.

À mes amis de toujours, Merci pour tous ces souvenirs partagés, pour votre soutien indéfectible, pour les éclats de rire, les discussions sans fin, et les moments de complicité qui ont fait de ce parcours une aventure humaine inoubliable. Vous avez su être présents dans les moments de doute comme dans les moments de réussite, et c'est grâce à vous que j'ai pu garder le cap et avancer avec sérénité.

Et tout particulièrement à **Lina**,

Ta présence lumineuse a été un véritable cadeau dans ma vie. Merci pour ta patience, ta compréhension, ton écoute et ton soutien dans les moments les plus difficiles. Tu as cru en moi même lorsque moi-même je doutais. Ta gentillesse, ta douceur et ta force m'ont porté et

inspiré. Ce travail est aussi le tien, car tu as su m'encourager, me rassurer et me donner l'énergie nécessaire pour aller au bout de ce projet. Je t'en suis profondément reconnaissant.

À tous ceux qui, de près ou de loin, ont croisé mon chemin, m'ont tendu la main, m'ont offert un sourire ou un mot d'encouragement, je vous dédie aussi ce travail. Il est le fruit d'un parcours collectif, d'un soutien familial et amical, et d'une chaîne d'amour et de bienveillance sans laquelle rien n'aurait été possible.

ABSTRACT

Halophilic microalgae, isolated from sebkhas (salt lakes), represent a valuable resource for aquaculture due to their ability to thrive in extreme salinity conditions while producing bioactive biomolecules with high biotechnological and industrial potential, such as carotenoid pigments, and more specifically β -carotene. This pigment, known for its powerful antioxidant properties, is particularly interesting for feeding aquatic species, improving their health and natural coloration. It also offers significant benefits for human health by acting as a precursor to vitamin A and supporting immune function.

In our study, we cultivated these microalgae in seawater-based media, attempting to replicate their natural living conditions in order to better understand their development cycles and achieve the most optimal growth possible. After a controlled growth period of three months, we obtained promising results. Indeed, the seawater-based culture media allowed us to obtain a much denser and more vigorous biomass, with a notably significant increase in cell concentration. To maximize β -carotene production, the next steps will involve modulating the salinity of the culture media, a known stress factor that stimulates this production.

This approach could offer a sustainable and natural solution to enrich the diets of aquaculture organisms and strengthen their resistance to environmental stresses.

RESUME

Les microalgues halophiles, isolées des sebkhas (lacs salés), représentent une ressource précieuse pour l'aquaculture en raison de leur capacité à prospérer dans des conditions de salinité extrême tout en produisant des biomolécules bioactives à fort potentiel biotechnologique et industriel, telles que les pigments caroténoïdes, et plus particulièrement le β -carotène. Ce pigment, reconnu pour ses puissantes propriétés antioxydantes, est particulièrement intéressant pour l'alimentation des espèces aquatiques, améliorant leur santé et leur coloration naturelle. Il offre également des bénéfices importants pour la santé humaine en agissant comme précurseur de la vitamine A et en soutenant le système immunitaire.

Dans notre étude, nous avons cultivé ces microalgues dans des milieux à base d'eau de mer, en tentant de reproduire leurs conditions naturelles de vie afin de mieux comprendre leurs cycles de développement et d'atteindre une croissance optimale. Après une période de croissance contrôlée de trois mois, nous avons obtenu des résultats prometteurs. En effet, les milieux de culture à base d'eau de mer nous ont permis d'obtenir une biomasse beaucoup plus dense et vigoureuse, avec une augmentation notable de la concentration cellulaire. Pour maximiser la production de β -carotène, les prochaines étapes consisteront à moduler la salinité du milieu de culture, un facteur de stress connu pour stimuler cette production.

Cette approche pourrait offrir une solution durable et naturelle pour enrichir les régimes alimentaires des organismes aquacoles et renforcer leur résistance aux stress environnementaux.

مُلخَص

تمثل الطحالب الدقيقة المحبة للملوحة، المعزولة من السبخات (البرك المالحة)، مورداً قيماً للاستزراع المائي بسبب قدرتها على النمو في ظروف ملوحة شديدة مع إنتاج جزيئات حيوية نشطة ذات إمكانات عالية في المجالات البيوتكنولوجية والصناعية، مثل أصباغ الكاروتينويد، وبشكل خاص البيتا كاروتين. يُعرف هذا الصبغ بخصائصه القوية كمضاد للأكسدة، وهو ذو أهمية خاصة في تغذية الكائنات المائية، حيث يحسن صحتها ولونها الطبيعي. كما يقدم فوائد كبيرة لصحة الإنسان من خلال كونه مقدمة لفيتامين أ ودعم الجهاز المناعي

في دراستنا، قمنا بزراعة هذه الطحالب الدقيقة في وسط قائم على ماء البحر، محاولين تقليد ظروف معيشتها الطبيعية لفهم دورات نموها بشكل أفضل وتحقيق أفضل نمو ممكن. بعد فترة نمو محكومة استمرت ثلاثة أشهر، حصلنا على نتائج واعدة. بالفعل، سمح لنا وسط الزراعة القائم على ماء البحر بالحصول على كتلة حيوية أكثر كثافة وحيوية، مع زيادة ملحوظة في تركيز الخلايا. لتعظيم إنتاج البيتا كاروتين، سنتشمل الخطوات التالية تعديل ملوحة وسط الزراعة، وهو عامل إجهاد معروف يحفز هذا الإنتاج

يمكن أن تقدم هذه الطريقة حلاً مستداماً وطبيعياً لإثراء تغذية الكائنات المستزرعة في الاستزراع المائي وتعزيز مقاومتها للضغوط البيئية

Table des matières

Remerciements

Dédicace

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

INTRODUCTION1

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE3

1	Généralités sur les microalgues.....	4
1.1	Diversité Phylogénétique des microalgues.....	4
1.2	Les microalgues Halophiles	5
1.3	Rôles écologiques et applications biotechnologiques	5
2	Présentation de l'espèce étudiée : <i>Dunaliella salina</i>	6
2.1	Taxonomie	6
2.2	Description Morphologique	6
2.3	Différenciation avec d'autres espèces du genre <i>Dunaliella</i>	7
2.4	Caractéristiques générales	8
3	Composition biochimique	9
4	Cycle de croissance	9
4.1	Phase de latence (Phase d'adaptation).....	10
4.2	Phase exponentielle (Croissance rapide).....	10
4.3	Phase stationnaire (Stress et accumulation de composés).....	11
4.4	Phase de reproduction sexuée et formes de résistance	11
4.5	Phase de déclin (Mort cellulaire).....	11
5	Adaptations biologiques et physiologiques au stress de <i>Dunaliella salina</i>	11
5.1	Osmorégulation par accumulation de glycérol.....	12

5.2	Protection contre le stress lumineux et oxydatif par le β -carotène	12
5.3	Adaptation membranaire aux variations thermiques.....	12
5.4	Optimisation de la photosynthèse en conditions extrêmes.....	12
5.5	Métabolisme lipidique et stockage énergétique	13
5.6	Capacités de détoxification	13
5.7	Réponse transcriptomique rapide	13
5.8	Particularités structurales	13
6	Techniques de culture de <i>Dunaliella salina</i>	15
6.1	Les différents systèmes de culture.....	15
6.1.1	Systèmes de culture ouverts.....	15
6.1.2	Photobioréacteurs fermés.....	16
6.1.3	Culture en étapes multiples	17
6.1.4	Co-culture avec d'autres microorganismes	19
6.2	Optimisation des paramètres environnementaux	19
6.3	Récolte de la biomasse	20
6.3.1	Floculation	20
6.3.2	Techniques avancées : Électrocoagulation.....	22
7	Intérêts biotechnologiques, valorisation et domaines d'applications.....	22
7.1	Domaine agro-alimentaire.....	23
7.2	Domaine de l'aquaculture	23
7.3	Domaine médical, pharmacologique et nutraceutique	23
7.4	Domaine cosmétique	24
7.5	Domaine environnemental	24
7.6	Autres applications émergentes.....	24
8	Limites et défis	25
CHAPITRE II: MATÉRIELS & MÉTHODES		26
I. Matériels		27

1	Matériels biologiques	27
2	Matériels non biologiques	27
II. Méthodes		28
1	Échantillonnage	28
1.1	Échantillonnage de l'espèce.....	28
1.2	Échantillonnage de l'eau de mer	28
1.3	Zones d'échantillonnage	29
1.3.1	Au niveau de la sebkha Ezzemoul	29
1.3.2	Station de dessalement de Palm Beach, Staoueli (Alger)	30
1.4	Évaluation de l'état de l'échantillon.....	31
1.5	Conservation des échantillons	31
2	Filtration	32
2.1	Protocole de filtration.....	32
2.2	Transfert des microalgues vers les milieux de culture	32
3	Etude des paramètres physico-chimiques de croissance	33
3.1	Impact de la salinité sur la croissance	34
3.2	Impact de l'origine de la lumière sur la croissance	34
3.3	Impact de la température sur la croissance.....	35
3.4	Impact de l'aération sur la croissance	35
3.5	Impact de l'agitation.....	36
4	Milieux de culture	36
4.1	La phase initiale : élaboration milieu de culture simple.....	36
4.2	La phase d'élaboration d'un milieu de culture optimisé	37
5	Étude comparative M1, M2, M3; évaluation de l'efficacité des milieux de culture sur la croissance de <i>Dunaliella salina</i>	38
5.1	Récolte de la biomasse	38
5.2	Séchage par lyophilisation	39

5.3	Évaluation du rendement en biomasse	39
6	Évaluation de l'accumulation de β -carotène chez <i>D. salina</i> sous différents gradients de NaCl	40
7	Conservation.....	40
CHAPITRE III : RÉSULTATS & DISCUSSION		41
Résultats et discussion.....		42
1	Evaluation de l'état de l'échantillon et conservation	42
2	Filtration et transfert vers les milieux de culture.....	43
3	Etude des paramètres physico-chimiques de croissance	44
3.1	Impact de la salinité sur la croissance	44
3.2	Impact de l'origine de la lumière sur la croissance	46
3.3	Impact de l'aération sur la croissance	47
3.4	Impact de l'agitation.....	48
4	Milieux de culture	48
4.1	La phase initiale : élaboration milieu de culture simple.....	49
5	Étude comparative M1, M2, M3 : évaluation de l'efficacité des milieux de culture sur la croissance de <i>Dunaliella salina</i>	50
5.1	Récolte de la biomasse	54
5.2	Séchage par lyophilisation	55
5.3	Évaluation du rendement en biomasse	57
6	Évaluation de l'accumulation de β -carotène chez <i>D. salina</i> sous différents gradients de NaCl	58
7	Interactions microalgues-bactéries dans les systèmes de culture.....	60
CONCLUSION.....		64
BIBLIOGRAPHIE		67
ANNEXES.....		71

Liste des figures

Figure 1. Diversité phylogénétique des microalgues halophiles.....	4
Figure 2. Aspects microscopiques de microalgues halophiles	5
Figure 3. Description morphologique du <i>Dunaliella salina</i> (Oren, 2014).....	7
Figure 4. Arbre phylogénétique illustrant la différenciation de souches.....	8
Figure 5. Valeur nutritionnelle et bioactive des microalgues halophiles : pigments, protéines, acides gras essentiels, vitamines et minéraux	9
Figure 6. Cycle de vie de <i>Dunaliella salina</i> illustrant les phases de multiplication végétative, de reproduction sexuée et de formation d'aplanospores (Zhang et al., 2022).....	10
Figure 7. Différentes formes de <i>Dunaliella salina</i>	15
Figure 8. Systèmes ouverts d'élevage de <i>Dunaliella salina</i> dans des étangs salins peu profonds (Andrei et Irina, 2020).....	16
Figure 9. Systèmes modulaires de photobioréacteurs fermés pour la culture de <i>Dunaliella salina</i> (Zhang et Wang, 2015)	17
Figure 10. Schéma des étapes successives de culture de <i>Dunaliella salina</i> pour l'optimisation de la production de β -carotène (Wang et Li, 2017).....	18
Figure 11. Schéma comparatif des méthodes de floculation appliquées à la récolte des microalgues, incluant la floculation chimique par NaOH (Li et Zhang, 2017).....	20
Figure 12. Schéma du procédé semi-continu de centrifugation pour la récolte de <i>Dunaliella salina</i> , incluant les étapes de culture, séparation et récupération de la biomasse adapté de Tanaka et al. (2024).	21
Figure 13. Configuration d'un système d'électrocoagulation utilisant une électrode hélicoïdale pour la récolte des microalgues (Jesse et Hun, 2023)	22
Figure 14. Domaines d'applications et valorisations de <i>Dunaliella salina</i>	25
Figure 15. La localisation de sebkha Ezzemoul à Ain M'lila (Google Maps)	30
Figure 16. Cartographie du zone d'échantillonnage de <i>Dunaliella salina</i> Palm beach, Alger .	31
Figure 17. Rampe de filtration	32
Figure 18. Transfert des microalgues vers les milieux de culture	33
Figure 19. Les milieux de culture réalisés (M1, M2, M3).	38
Figure 20. Lyophilisation (-40 °C et -20 °C).....	39
Figure 21. Photo des jerricanes d'eau du sebkha échantillonnée	42
Figure 22. Observations microscopiques des échantillons dès leur arrivée en laboratoire (T0), objectif $\times 40$	43
Figure 23. Transfert de la biomasse vers les milieux de culture après filtration.....	44
Figure 24. Impact de la salinité sur la croissance et la pigmentation de <i>Dunaliella salina</i>	45
Figure 25. Evaluation de l'efficacité des milieux de culture sur la croissance de <i>Dunaliella salina</i>	50
Figure 26. Observation microscopique de de <i>Dunaliella salina</i> à T0, objectif $\times 40$	51
Figure 27. Observation microscopique de l'évolution de <i>Dunaliella salina</i> dans le milieu M2 après une semaine de culture, objectif $\times 40$	52
Figure 28. Observation microscopique de évolution de <i>Dunaliella salina</i> dans le milieu M2 après un mois de culture, objectif $\times 40$	52

Figure 29. Observation microscopique de l'évolution de <i>Dunaliella salina</i> dans le milieu M2 après un mois et demi de culture, objectif $\times 40$	53
Figure 30. Observation microscopique de l'évolution de <i>Dunaliella salina</i> dans le milieu M2 après 2 mois de culture, objectif $\times 100$	53
Figure 31. Récolte de la biomasse obtenue après filtration.....	54
Figure 32. Récolte de la biomasse du <i>D. salina</i> , par grattage des membranes	55
Figure 33. Biomasse obtenue avant lyophilisation.....	56
Figure 34. Biomasses obtenues en milieux de croissance optimisés, après lyophilisation	56
Figure 35. Évaluation de l'accumulation de β -carotène chez <i>D. salina</i> sous différents gradients de NaCl (5, 10, 15, 20, 25 et 30 %)	58
Figure 36. Observation microscopique des cultures après plusieurs semaines de culture et appauvrissement du milieu optimisé, objectif $\times 40$	59
Figure 37. Différence Macroscopique entre les cultures en milieu optimisé de <i>D. salina</i> et celles présentant une croissance des Cyanobactéries	60
Figure 38. Observation microscopique des cyanobactéries (Berg et Sutula, 2015).....	61
Figure 39. Observation microscopique des cyanobactéries présentes dans les milieux optimisés, objectif $\times 40$ et $\times 100$	61

Liste des tableaux

Tableau I. Classification du <i>Dunaliella salina</i> Guiry et Guiry (2024).....	6
Tableau II. Caractéristiques des systèmes de culture ouverts utilisés pour la culture de <i>Dunaliella salina</i>	16
Tableau III. Paramètres optimisés de culture de <i>Dunaliella salina</i> en photobioréacteur fermé selon (Zhang et Wang, 2015).....	17
Tableau IV. Paramètres environnementaux optimisés pour la culture de <i>Dunaliella salina</i>	19
Tableau V. Liste des matériels non-biologiques et des réactifs utilisés pour la culture	27

Liste des abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ATP	Adénosine Triphosphate
BSA	Biomasse Sèche Algale
Chl	Chlorophylle
CO ₂	Dioxyde de carbone
FAO	Food and Agriculture Organization (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture)
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
M1, M2, M3	Milieux de culture testés
NaCl	Chlorure de sodium
O ₂	Dioxygène
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OD	Densité Optique (Optical Density)
pH	Potentiel Hydrogène
PSU	Practical Salinity Unit (Unité de salinité pratique)
T °C	Température (degrés Celsius)
UV	Ultraviolet
v/v	Volume sur volume
µg	Microgramme
mg/L	Milligramme par litre

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La sécurité alimentaire mondiale fait face à un défi majeur : d'ici 2050, il sera très difficile de nourrir l'ensemble de la population mondiale, estimée à près de 10 milliards d'habitants (Torero, 2024).

Selon les rapports de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), la production alimentaire devra augmenter d'au moins 60 % pour répondre à cette demande croissante. Cependant, la plupart des scénarios actuels indiquent que cette augmentation ne sera pas suffisante pour assurer une sécurité alimentaire durable à l'échelle planétaire (Torero, 2024).

En effet, plusieurs contraintes limitent cette capacité, notamment la déforestation liée à l'expansion des terres agricoles, la dégradation des sols, la raréfaction des ressources en eau, ainsi que les impacts du changement climatique qui affectent la production agricole (Torero, 2024). Par ailleurs, un déficit important en nutriments essentiels, tels que les protéines et les micronutriments, est prévu, ce qui pourrait aggraver la malnutrition et l'insécurité alimentaire dans de nombreuses régions du monde (Herforth et al., 2022).

Dans ce contexte, la pêche traditionnelle, bien que provenant d'immenses étendues marines, ne suffit plus à couvrir les besoins alimentaires mondiaux. Les stocks halieutiques sont largement surexploités, avec environ 90 % des espèces marines pêchées à leur capacité maximale ou au-delà (FAO, 2024). Cette situation limite la disponibilité durable de protéines marines issues de la pêche. Par conséquent, l'aquaculture apparaît comme une alternative stratégique pour augmenter la production de protéines aquatiques. Toutefois, les systèmes actuels d'aquaculture doivent être améliorés pour réduire leur impact environnemental et leur dépendance aux ressources naturelles limitées (Ben-Amotz et Avron, 1983).

C'est ici que la culture des algues, notamment des microalgues halophiles, offre un potentiel considérable. Les algues ne nécessitent pas de terres arables, consomment peu d'eau douce et contribuent à la séquestration du dioxyde de carbone, participant ainsi à la lutte contre le changement climatique (Abu-Rezq et al., 2010). La production mondiale d'algues a atteint un niveau record de 37,8 millions de tonnes en 2022, principalement grâce à l'aquaculture, ce qui illustre l'importance croissante de cette filière dans la satisfaction de la demande alimentaire mondiale (FAO, 2024). Les microalgues, en particulier, se distinguent par leur rapidité de croissance, avec des temps de doublement de biomasse pouvant être inférieurs à 24 heures, bien plus rapides que les macroalgues (Lavilab, 2024).

INTRODUCTION

Certaines espèces halophiles, telles que *Dunaliella salina*, sont capables de résister à des conditions extrêmes de salinité et de produire des biomolécules à forte valeur ajoutée, notamment le β -carotène, un pigment aux propriétés antioxydantes et nutraceutiques reconnues (Ben-Amotz et Avron, 1983; Herrero et al., 2009).

La valorisation des saumures et eaux issues des stations de dessalement pour la culture de microalgues halophiles, telles que *Dunaliella salina*, représente une opportunité innovante et durable. Ces microalgues, capables de croître dans des milieux à forte salinité, peuvent transformer ces rejets hypersalins en biomasse riche en composés à haute valeur ajoutée. *Dunaliella salina* est notamment reconnue pour sa production de β -carotène, un pigment aux propriétés antioxydantes et nutraceutiques, ainsi que pour sa capacité à s'adapter à des conditions extrêmes.

L'utilisation de *Dunaliella salina* dans l'alimentation aquacole, en complément nutritionnel pour poissons et crevettes, améliore la qualité des élevages et contribue à la durabilité de la filière aquacole algérienne. Par ailleurs, cette microalgue possède un potentiel pharmaceutique important, étant employée comme complément alimentaire pour l'être humain grâce à ses vertus antioxydantes et immunostimulantes.

En Algérie, le secteur des algues et microalgues reste encore largement inexploré, malgré un fort potentiel lié à la richesse des milieux hypersalins et au climat favorable. Ce domaine vierge représente une opportunité stratégique pour développer une bioéconomie bleue locale, capable de contribuer à la sécurité alimentaire et à la diversification économique (Ben Ouada, 2016). Les microalgues, grâce à leur croissance rapide et leur résistance, sont particulièrement adaptées à une exploitation industrielle optimisée.

Le présent travail s'inscrit dans cette dynamique. Il vise à développer des milieux de culture adaptés aux microalgues halophiles locales, à optimiser les facteurs influençant leur croissance et la production de biomolécules d'intérêt, notamment le β -carotène. L'objectif final est la valorisation de ces biomolécules en tant que compléments alimentaires pour la pisciculture, améliorant ainsi la qualité nutritionnelle des aliments pour poissons et contribuant à une aquaculture plus durable et performante, ainsi que des compléments alimentaires pour l'être humain.

CHAPITRE I
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

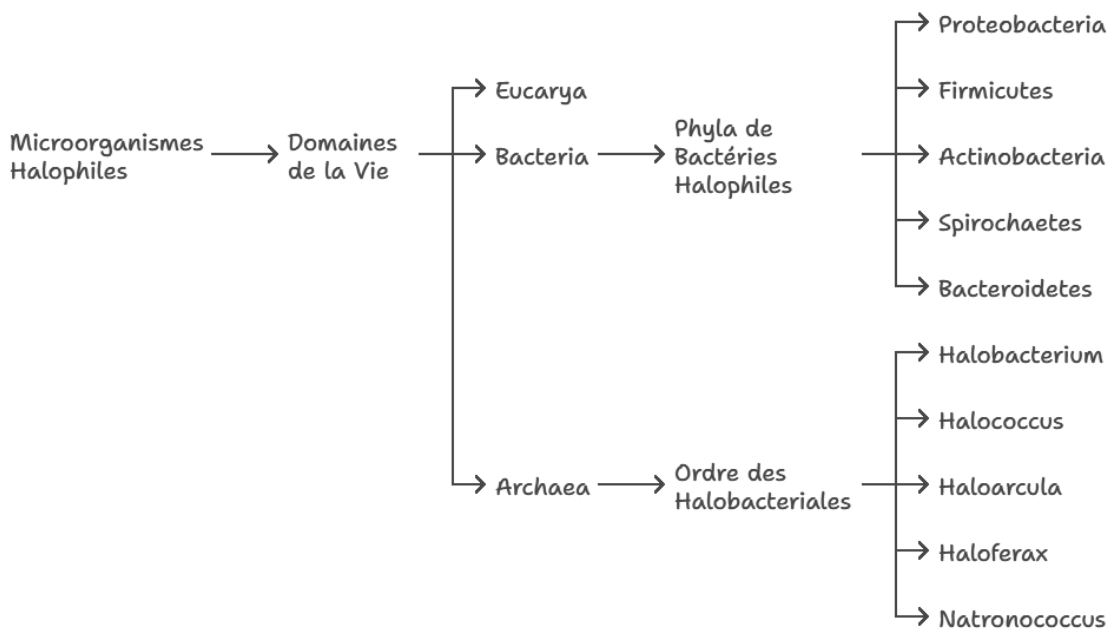
1 Généralités sur les microalgues

1.1 Diversité Phylogénétique des microalgues

Les microorganismes halophiles présentent une diversité phylogénétique importante, appartenant aux trois domaines de la vie : *Eucarya*, *Bacteria* et *Archaea*. Cependant, ils sont plus répandus dans les arbres phylogénétiques des procaryotes, notamment les archées et les bactéries (Daoud et Ben Ali, 2020). Les bactéries halophiles sont incluses dans plusieurs phyla, dont *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes* et *Bacteroidetes* (Oumsalem et Zanoun, 2019).

Les archées halophiles, quant à elles, sont principalement classées dans l'ordre des *Halobacteriales*, qui comprend des genres tels que *Halobacterium*, *Halococcus*, *Haloarcula*, *Haloferax*, et *Natronococcus* (Oren, 2002; Kumar et Tiwari, 2019). Ces organismes sont souvent isolés de lacs et d'étangs salés, de marais salants et de sédiments marins (Oren, 2011).

Diversité Phylogénétique des Microorganismes Halophiles



Made with Napkin

Figure 1. Diversité phylogénétique des microalgues halophiles.

1.2 Les microalgues Halophiles

Les microalgues halophiles (Figure 02) sont des micro-organismes photosynthétiques capables de se développer dans des environnements à forte concentration en sel, souvent supérieures à 3,5 % et pouvant atteindre la saturation (35 %) (Daoud et BenAli, 2020).

Ces microalgues ont développé des mécanismes d'adaptation spécifiques pour survivre à ce stress osmotique, notamment par l'accumulation de composés organiques compatibles qui équilibrent la pression osmotique sans perturber leurs fonctions cellulaires (Wang et al., 2021; Ginzburg et al., 2020).

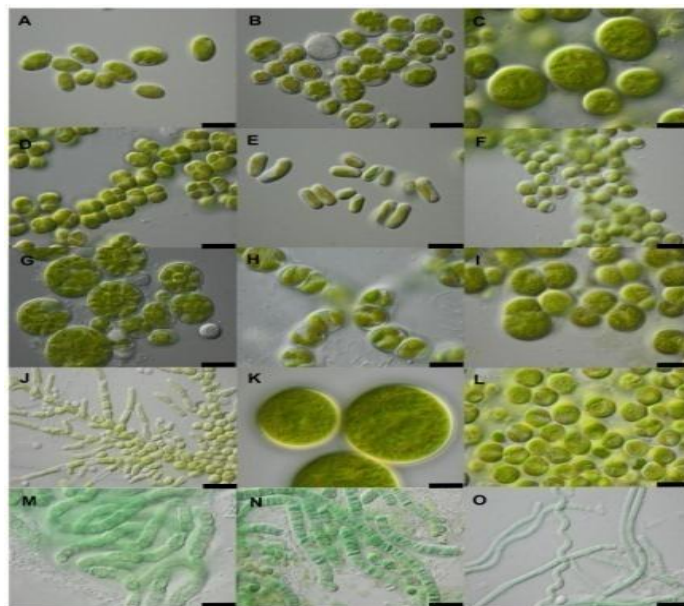


Figure 2. Aspects microscopiques de microalgues halophiles

On distingue plusieurs types d'halophilie selon la concentration en sel requise pour leur croissance, à savoir ;

- Les halophiles faibles, tolèrent environ 3 % de salinité.
- Les halophiles modérés, tolèrent entre 3 % et 15 %.
- Les halophiles extrêmes, tolèrent jusqu'à 25 % ou plus (Daoud et BenAli, 2020).

1.3 Rôles écologiques et applications biotechnologiques

Ces microalgues jouent un rôle écologique important dans les milieux hypersalins tels que les marais salants, sebkhas et lacs salés, où peu d'autres organismes peuvent survivre.

Parmi elles, le genre *Dunaliella* est particulièrement étudié pour sa capacité à produire des pigments caroténoïdes, notamment le β -carotène, aux propriétés antioxydantes et nutraceutiques (Herrero et al., 2009).

Ainsi, les microalgues halophiles représentent une ressource biotechnologique précieuse pour la production de biomolécules d'intérêt dans des conditions extrêmes, offrant des applications dans les domaines de la nutrition, de la pharmacie et de l'aquaculture (Daoud et BenAli, 2020).

2 Présentation de l'espèce étudiée : *Dunaliella salina*

2.1 Taxonomie

Dunaliella salina est une microalgue verte, unicellulaire appartenant au règne des Eucaryotes, au clade des *Viridiplantae*, et à la division des *Chlorophyta*. Elle est classée dans la classe des *Chlorophyceae*, l'ordre des *Chlamydomonadales*, la famille des *Dunaliellaceae*, et le genre *Dunaliella* (Guiry et Guiry, 2024). (**Tableau I**)

Le nom binomial complet de cette espèce est *Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco. Cette classification a été établie en 1905 par Emanoil C. Teodoresco, qui a nommé l'espèce en hommage à Michel Félix Dunal, son découvreur initial en 1838 dans les marais salants de Montpellier, France (Borowitzka et Siva, 2007).

Tableau 1. Classification du *Dunaliella salina* Guiry et Guiry (2024).

Rang taxonomique	Classification
Règne	<i>Eucaryota</i>
Clade	<i>Viridiplantae</i>
Division	<i>Chlorophyta</i>
Classe	<i>Chlorophyceae</i>
Ordre	<i>Chlamydomonadales</i>
Famille	<i>Dunaliellaceae</i>
Genre	<i>Dunaliella</i>
Espèce	<i>Dunaliella salina</i> (Dunal) Teodoresco

2.2 Description Morphologique

Morphologiquement, *Dunaliella salina* est une algue unicellulaire dépourvue de paroi cellulaire rigide. Cette absence de paroi confère à la cellule une grande flexibilité morphologique, lui permettant de s'adapter aux variations osmotiques dans les environnements hypersalins (Borowitzka & Siva, 2007). Les cellules sont généralement ovoïdes ou ellipsoïdales et mesurent entre 8 et 16 μm de longueur. Elles possèdent deux

flagelles isométriques qui leur permettent de se déplacer activement dans leur milieu aquatique (Borowitzka et Borowitzka, 1987).

Le chloroplaste de *D. salina*, en forme de coupe, occupe une grande partie du volume cellulaire. Il contient un pyrénoïde central distinct entouré d'amyloplastés, qui jouent un rôle clé dans la synthèse et le stockage d'amidon (Borowitzka et Siva, 2007; Polle et al., 2009). Ce chloroplaste est également le site principal de l'accumulation de β -carotène sous stress lumineux ou salin, pigment qui donne souvent à l'algue une coloration rougeâtre ou orange lorsqu'elle est exposée à des conditions extrêmes (Ginzburg et al., 2022).

La membrane plasmique de *D. salina* est hautement perméable au sel mais maintient une faible perméabilité au glycérol afin d'éviter sa perte excessive dans l'environnement hypersalin. Le glycérol est synthétisé en réponse aux concentrations élevées de sel pour équilibrer la pression osmotique et protéger les enzymes cellulaires (Oren, 2005; Ginzburg et al., 2022).

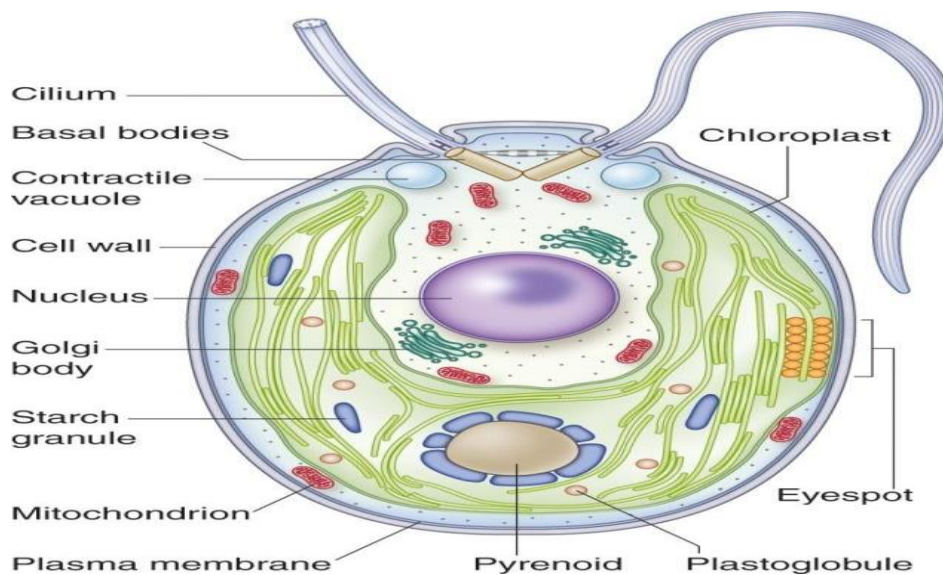


Figure 3. Description morphologique du *Dunaliella salina* (Oren, 2014)

2.3 Différenciation avec d'autres espèces du genre *Dunaliella*

La différenciation entre les espèces du genre *Dunaliella*, notamment entre *D. salina* et ses proches parents comme *Dunaliella viridis*, repose sur des critères morphologiques et biochimiques spécifiques. Par exemple, *D. salina* se distingue par sa capacité à accumuler jusqu'à 14 % de son poids sec en β -carotène sous stress environnemental intense (Ben-Amotzet Avron, 1983). En revanche, *D. viridis* reste verte même sous des conditions similaires en raison d'une moindre production de caroténoïdes.

Les études moléculaires basées sur les séquences génétiques ont confirmé que *D. salina* forme un groupe distinct au sein du genre *Dunaliella*. Ces analyses ont également permis d'éclaircir certaines ambiguïtés taxonomiques liées aux variations morphologiques observées chez différentes souches cultivées dans des environnements variés (Fawley et al., 2007; Oren, 2014).

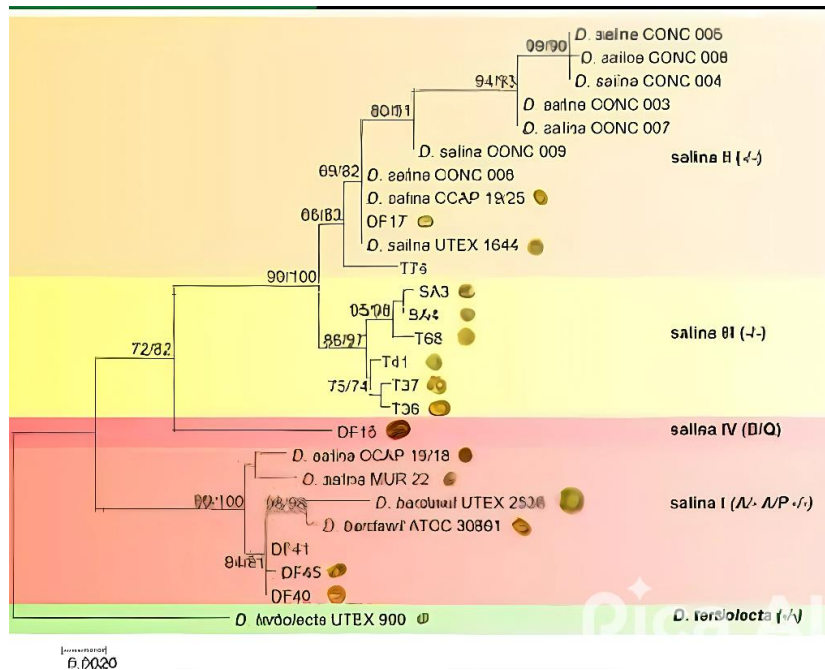


Figure 4. Arbre phylogénétique illustrant la différenciation de souches de *Dunaliella* (notamment *D. salina*, *D. viridis* et autres espèces du genre), basé sur l’analyse combinée de marqueurs moléculaires (ITS, *rbcL*, *tufA* et 18S rRNA), révélant la structuration en clades et sous-clades récents (d’après Polle et al., 2020; Highfield et al., 2021; Lortou et al., 2023).

2.4 Caractéristiques générales

Dunaliella salina est une microalgue verte unicellulaire appartenant à la famille des *Dunaliellaceae*. Elle est particulièrement connue pour sa capacité à prospérer dans des environnements hypersalins, avec une tolérance aux concentrations de NaCl allant de 0,2 % à environ 35 % (Borowitzka et al., 2007). Cette algue est très répandue dans les lacs salés, les lagons et les marais salants du monde entier, où elle peut atteindre des densités élevées (Guiry et Guiry, 2024).

Contrairement à d'autres algues, *D. salina* ne possède pas de paroi cellulaire rigide, ce qui lui confère une grande flexibilité morphologique (Borowitzka et al., 2007).

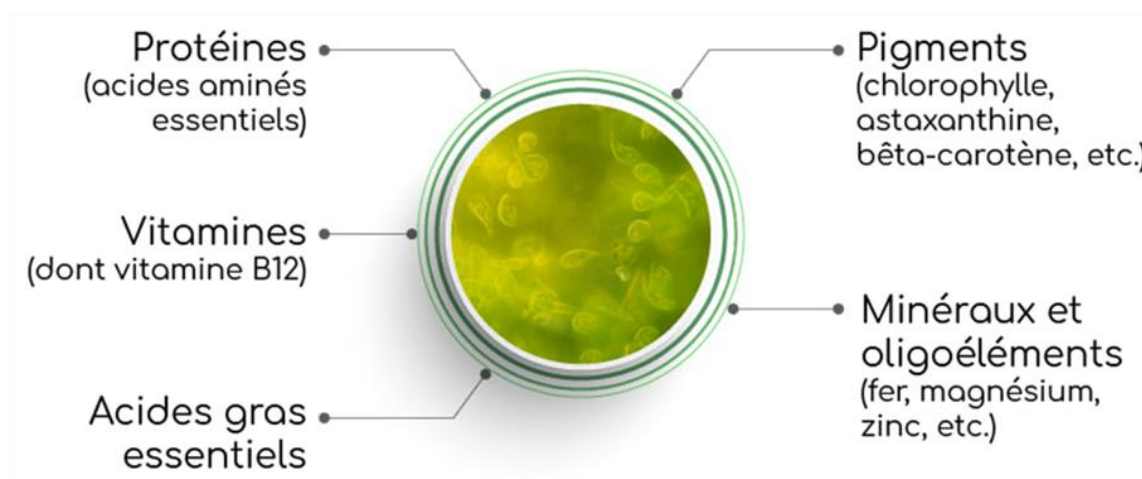


Figure 5. Valeur nutritionnelle et bioactive des microalgues halophiles : pigments, protéines, acides gras essentiels, vitamines et minéraux

3 Composition biochimique

La composition biochimique de *D. salina* est également très intéressante. Elle est riche en caroténoïdes (β -carotène, astaxanthine), en protéines (50-80 % des protéines sont constituées d'acides aminés essentiels), en polysaccharides et en lipides (Borowitzka, 2013; Khan et al., 2018).

Elle contient également des composés phénoliques et des xanthophylles comme la lutéine et la zéaxanthine, qui possèdent d'importantes propriétés antioxydantes (Khan et al., 2018). Ces biomolécules lui confèrent un large éventail d'applications biotechnologiques.

4 Cycle de croissance

La croissance de *Dunaliella salina* se déroule en plusieurs phases distinctes, dont la durée et l'intensité varient en fonction des conditions environnementales telles que la salinité, la lumière, la température et la disponibilité des nutriments.

Ces facteurs influencent la dynamique cellulaire, en modulant chaque phase; les phases de latence, de croissance exponentielle, de ralentissement puis de déclin, afin d'optimiser la survie et la production de biomasse dans des milieux souvent extrêmes.

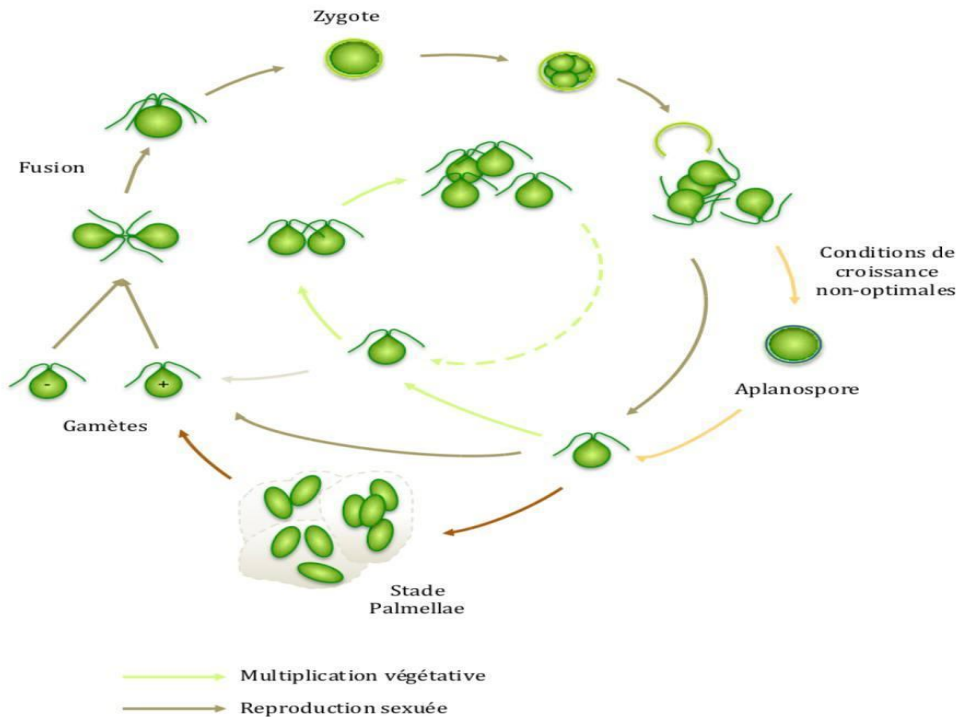


Figure 6. Cycle de vie de *Dunaliella salina* illustrant les phases de multiplication végétative, de reproduction sexuée et de formation d'aplanospores (Zhang et al., 2022)

4.1 Phase de latence (Phase d'adaptation)

Après l'inoculation dans un nouveau milieu, *Dunaliella salina* entre dans une phase de latence où les cellules s'adaptent aux conditions environnementales (salinité, lumière, température, disponibilité des nutriments). Durant cette période, la division cellulaire est minimale ou absente, mais les cellules réorganisent leur métabolisme pour optimiser la croissance future. Cette phase peut durer de quelques heures à plusieurs jours selon la qualité du milieu et l'état physiologique initial des cellules (Borowitzka et Siva, 2007; Massyuk et al., 2021).

4.2 Phase exponentielle (Croissance rapide)

Une fois adaptées, les cellules entrent dans la phase exponentielle caractérisée par une division cellulaire active et rapide par fission longitudinale. La biomasse augmente de façon exponentielle, avec un temps de doublement pouvant être inférieur à 24 heures sous conditions optimales (Ben Hamed et al., 2022).

Durant cette phase, la microalgue maximise la photosynthèse, la synthèse des protéines, et la production de biomasse. La forme cellulaire est principalement bi-flagellaire, mobile, ce qui favorise l'accès à la lumière et aux nutriments (Abu-Rezq et al., 2010).

4.3 Phase stationnaire (Stress et accumulation de composés)

Lorsque les nutriments deviennent limitants ou que les conditions environnementales se dégradent (par exemple, forte salinité, intensité lumineuse élevée), la croissance cellulaire ralentit et la biomasse se stabilise. C'est à ce stade que *Dunaliella salina* commence à accumuler des composés secondaires, notamment du β -carotène, un pigment antioxydant qui protège la cellule contre le stress oxydatif induit par la lumière et la salinité extrême (Borowitzka et al., 2020; Koutra et al., 2023).

Parallèlement, la microalgue synthétise du glycérol en grande quantité pour équilibrer la pression osmotique entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule, ce qui lui permet de survivre dans des milieux hypersalins (jusqu'à 5,5 M NaCl) (Ben-Amotz et Avron, 1983; Goyal, 2021). Ce mécanisme de régulation osmotique est rapide, s'accomplissant en environ 2 heures après un choc salin (Zhang et al., 2023).

4.4 Phase de reproduction sexuée et formes de résistance

En réponse à des conditions environnementales défavorables, notamment une dessalure ou une limitation en azote, *Dunaliella salina* peut initier une reproduction sexuée de type hétérothallique et isogamique. Deux gamètes mobiles fusionnent pour former un planozygote diploïde tétraflagellé, qui perd ses flagelles et forme un zygote à paroi résistante (cyste). Ce zygote peut ensuite germer en plusieurs cellules filles lors d'un retour à des conditions favorables (Borowitzka, 1981; Borowitzka et Siva, 2007).

Par ailleurs, sous stress sévère, les cellules végétatives peuvent se transformer en aplanospores, des formes de résistance à paroi rigide et dépourvues de flagelles, leur permettant de survivre jusqu'à amélioration des conditions (Zhang et al., 2023).

4.5 Phase de déclin (Mort cellulaire)

Si les conditions restent défavorables, la viabilité cellulaire diminue progressivement. La biomasse décline en raison de la sénescence cellulaire, du stress oxydatif non compensé, et de l'épuisement des ressources nutritives (Borowitzka et Siva, 2007).

5 Adaptations biologiques et physiologiques aux stress de *Dunaliella salina*

Dunaliella salina est une microalgue halophile remarquable par sa capacité à survivre et prospérer dans des environnements hypersalins caractérisés par des conditions extrêmes de

salinité, de lumière et de température. Cette résistance exceptionnelle repose sur plusieurs mécanismes métaboliques et physiologiques complémentaires.

5.1 Osmorégulation par accumulation de glycérol

Pour faire face à la pression osmotique élevée des milieux hypersalins, *D. salina* synthétise rapidement du glycérol intracellulaire à partir du dihydroxyacétone phosphate (DHAP). Ce soluté organique compatible permet d'équilibrer l'osmolarité sans perturber les fonctions enzymatiques, garantissant ainsi l'intégrité cellulaire même en présence de fortes concentrations de sel. La production de glycérol est finement régulée en fonction de la salinité externe (Wang et al, 2021; Ginzburg et al, 2022).

5.2 Protection contre le stress lumineux et oxydatif par le β -carotène

Sous stress salin, lumineux ou nutritif (carence en azote), *D. salina* accumule de grandes quantités de β -carotène, pouvant atteindre jusqu'à 14-25 % de son poids sec (Borowitzka et al., 2020; Sousa et al., 2024).

Ce pigment joue un rôle crucial dans la protection des cellules contre les dommages causés par les radiations UV et le stress oxydatif (Takaichi, 2011; Wolf et al., 2020). Par exemple, en conditions contrôlées de salinité (15-25 %) et d'azote (5 mM), la production peut atteindre 39 mg/L (Mouradi et al., 2009).

5.3 Adaptation membranaire aux variations thermiques

Les variations extrêmes de température dans les milieux hypersalins induisent une modification dynamique de la composition lipidique membranaire. *D. salina* augmente la proportion d'acides gras insaturés dans ses membranes, ce qui permet de maintenir leur fluidité et d'assurer le bon fonctionnement des protéines membranaires impliquées dans le transport actif et la signalisation cellulaire (Chen et al, 2021; Kumar et al, 2023).

5.4 Optimisation de la photosynthèse en conditions extrêmes

Pour maximiser l'efficacité photosynthétique malgré le stress osmotique et lumineux, *D. salina* ajuste la structure de ses chloroplastes et produit des pigments accessoires tels que les xanthophylles (Goss & Jakob, 2010; Takaichi, 2011).

Elle module également l'expression des protéines du photosystème II et active la dissipation non photochimique (*Non-Photochemical Quenching*; *NPQ*) pour limiter la photo-inhibition (Allakhverdiev et al., 2008; Goss et Lepetit, 2015).

5.5 Métabolisme lipidique et stockage énergétique

En situation de stress nutritionnel, notamment en cas de limitation en azote ou phosphore, l'algue accumule des lipides neutres sous forme de triacylglycérols (TAG).

Ces lipides servent à la fois de réserves énergétiques et de renforcement structurel des membranes cellulaires face aux contraintes osmotiques et thermiques (Li et al., 2014).

5.6 Capacités de détoxification

Les milieux hypersalins sont souvent contaminés par des métaux lourds (cadmium, plomb, cuivre). *D. salina* possède une capacité remarquable à absorber ces polluants via des groupes fonctionnels membranaires (hydroxyles, carboxyles) et à isoler les toxines dans ses vacuoles, limitant ainsi leur impact sur le métabolisme cellulaire (Zhang et al., 2024).

5.7 Réponse transcriptomique rapide

Face à un choc salin, *D. salina* modifie l'expression de nombreux gènes en quelques minutes à heures, notamment ceux liés au métabolisme du carbone, à la réparation de l'ADN et à la gestion du stress oxydatif, ce qui lui permet une adaptation rapide et efficace (Goyal et al., 2022).

5.8 Particularités structurales

Dunaliella salina est une microalgue unicellulaire appartenant au genre *Dunaliella*, caractérisée par une grande plasticité morphologique et une adaptation remarquable aux environnements hypersalins. Sa cellule présente une forme monadique, généralement ovoïde, sphéroïdale, ellipsoïdale ou fusiforme, avec des dimensions variables selon les conditions de culture et la phase de croissance, allant de 2,8 à 40 μm de longueur.

Cette variabilité morphologique est une réponse adaptative à l'environnement, notamment à la salinité, à la lumière et à la disponibilité des nutriments, reflétant un haut niveau de plasticité phénotypique.

Au niveau ultrastructural, la cellule de *D. salina* est dépourvue de paroi rigide classique, ce qui lui confère une grande flexibilité osmotique, essentielle pour survivre dans des milieux à forte concentration saline. Elle est entourée d'une membrane plasmique perméable à l'eau mais imperméable au glycérol, un osmolyte intracellulaire majeur qui joue un rôle clé dans l'adaptation osmotique. Cette accumulation de glycérol permet à la cellule de réguler sa pression osmotique interne face aux variations extrêmes de salinité.

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

La cellule est biflagellée, avec deux flagelles identiques situés à l'apex, assurant la mobilité active dans le milieu aqueux. Ces flagelles permettent à la microalgue de se déplacer vers des zones plus favorables en termes de lumière ou de nutriments, optimisant ainsi sa photosynthèse et sa croissance. La mobilité est un facteur important pour la survie dans des environnements fluctuants.

Le chloroplaste de *D. salina* est unique et volumineux, en forme de coupe, occupant une grande partie du cytoplasme. Il contient un pyrénoïde central entouré d'amidon, siège de la fixation du CO₂ et de la synthèse des glucides. Ce chloroplaste est le lieu principal de la photosynthèse et de la production des pigments chlorophylliens et caroténoïdes.

Parmi ces pigments, le β -carotène est particulièrement abondant, s'accumulant sous forme de gouttelettes lipidiques dans le stroma chloroplastique en réponse au stress environnemental, notamment à la forte lumière et à la salinité élevée. Cette accumulation confère à la cellule une coloration allant du jaune-brun à l'orange vif, voire rougeâtre, qui protège la chlorophylle contre la photo-oxydation et les rayons UV.

Sur le plan reproductif, *D. salina* présente un cycle de vie complexe avec une reproduction sexuée hétérothallique et isogamique. Sous conditions défavorables ou dessalures, les cellules haploïdes mobiles (gamètes) fusionnent pour former un zygote tétraflagellé à paroi résistante, qui peut entrer en dormance avant de germer en plusieurs cellules filles. En conditions stressantes, les cellules végétatives peuvent aussi se transformer en aplanospores, formes de résistance à paroi rigide dépourvues de flagelles, assurant la survie en milieu hostile. Ces adaptations structurales et reproductives participent à la résilience écologique de l'espèce.

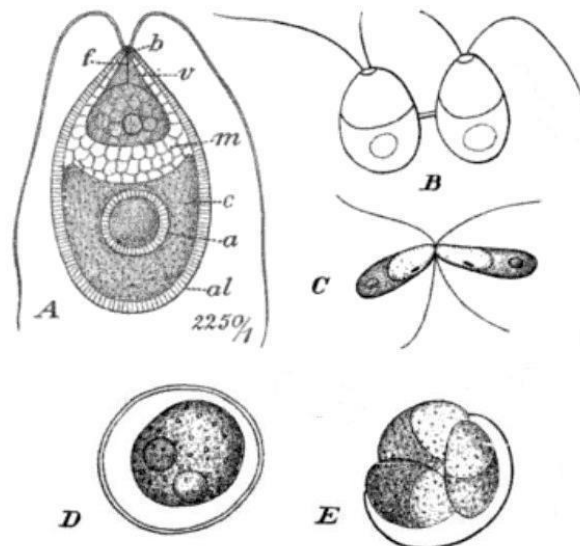


Figure 7. Différentes formes de *Dunaliella salina*

Enfin, la morphométrie cellulaire évolue au cours des phases de croissance : durant la phase dite « verte » (croissance active), les cellules sont plus petites, avec une longueur moyenne autour de 16-17 μm , tandis qu'en phase « rouge » (stress et accumulation de pigments), la taille cellulaire augmente jusqu'à 20 μm , avec une forme plus sphéroïdale. Cette variation reflète l'état physiologique de la cellule et son adaptation aux conditions de culture.

6 Techniques de culture de *Dunaliella salina*

La culture de *Dunaliella salina* nécessite des conditions spécifiques pour optimiser sa croissance et la production de composés d'intérêt comme le β -carotène, ou encore le Glycérolé. Différentes méthodes, incluant des systèmes ouverts et fermés, ont été développées pour répondre aux besoins industriels et scientifiques.

6.1 Les différents systèmes de culture

6.1.1 Systèmes de culture ouverts

Les systèmes ouverts, tels que les bassins peu profonds ou les étangs salins, sont les plus couramment utilisés en raison de leur faible coût. Ces systèmes exploitent des environnements naturels avec une salinité élevée pour limiter la contamination par d'autres organismes.

Par exemple, dans les étangs salins, une salinité de 15-25 % (**Tableau II.**) est maintenue pour favoriser la croissance de *D. salina* tout en inhibant les compétiteurs microbiens (Mouradi et al., 2009; Caia, 2018).

Tableau II. Caractéristiques des systèmes de culture ouverts utilisés pour la culture de *Dunaliella salina*

Critère	Événement dans les étangs salins
Structure	Bassins peu profonds (20–30 cm)
Salinité	15–25 % (150–250 g/L)
Coût	Très faible
Contrôle environnemental	Limité (exposé aux aléas)
Contamination	Faible car salinité élevée, mais possible
Avantages et limitations	Idéal pour <i>D. salina</i> , mais sensible au climat

Cependant, ces systèmes présentent des inconvénients, notamment une exposition aux variations climatiques et un contrôle limité des paramètres environnementaux.

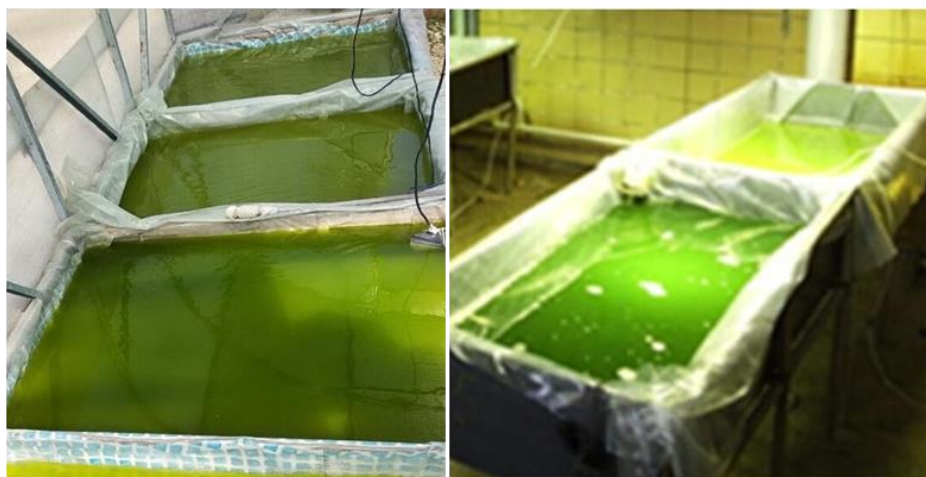


Figure 8. Systèmes ouverts d'élevage de *Dunaliella salina* dans des étangs salins peu profonds (Andrei et Irina, 2020).

6.1.2 Photobioréacteurs fermés

Les photobioréacteurs fermés permettent un meilleur contrôle des conditions de culture, notamment la température, l'intensité lumineuse et la composition du milieu nutritif.



Figure 9. Systèmes modulaires de photobioréacteurs fermés pour la culture de *Dunaliella salina* (Zhang et Wang, 2015)

Une méthode optimisée utilise un photobioréacteur contenant un substrat composé de 0,3-0,5 g/L de NaNO_3 , 0,01-0,025 g/L de KH_2PO_4 , 1 mL/L de Fe-EDTA et des oligoéléments (Zhang et Wang, 2015). Les cultures sont maintenues à une température de 23-25 °C avec une alternance lumière/obscurité (12h/12h) et une intensité lumineuse de 2000-3000 lx. Cette méthode permet d'obtenir une extraction de β -carotène atteignant 14,45 %, contre seulement 8-10 % dans les méthodes classiques (Zhang et Wang, 2015).

Tableau III. Paramètres optimisés de culture de *Dunaliella salina* en photobioréacteur fermé selon (Zhang et Wang, 2015)

Paramètre	Valeur mentionnée
NaNO_3	0,3–0,5 g/L
KH_2PO_4	0,01–0,025 g/L
Fe-EDTA	1 mL/L
Oligoéléments	Présents dans le milieu selon Zhang et Wang, 2015
Température	23–25 °C
Cycle lumière/obscurité	12 h/12 h
Intensité lumineuse	2 000–3 000 lux
Rendement en β -carotène	Jusqu'à 14,45 %, vs. 8–10 % en méthodes classiques.

6.1.3 Culture en étapes multiples

Une technique en quatre étapes a été développée pour maximiser la productivité, comportant :

- Phase d'adaptation : Les cellules sont cultivées dans un milieu riche en nutriments pour atteindre la phase exponentielle.

- Phase d'accumulation : La concentration en azote est réduite pour induire l'accumulation de β -carotène.
- Phase d'optimisation : Les paramètres lumineux et salins sont ajustés pour maximiser la production.
- Récolte : Les cellules sont récoltées par floculation ou centrifugation (Wang et Li, 2017).

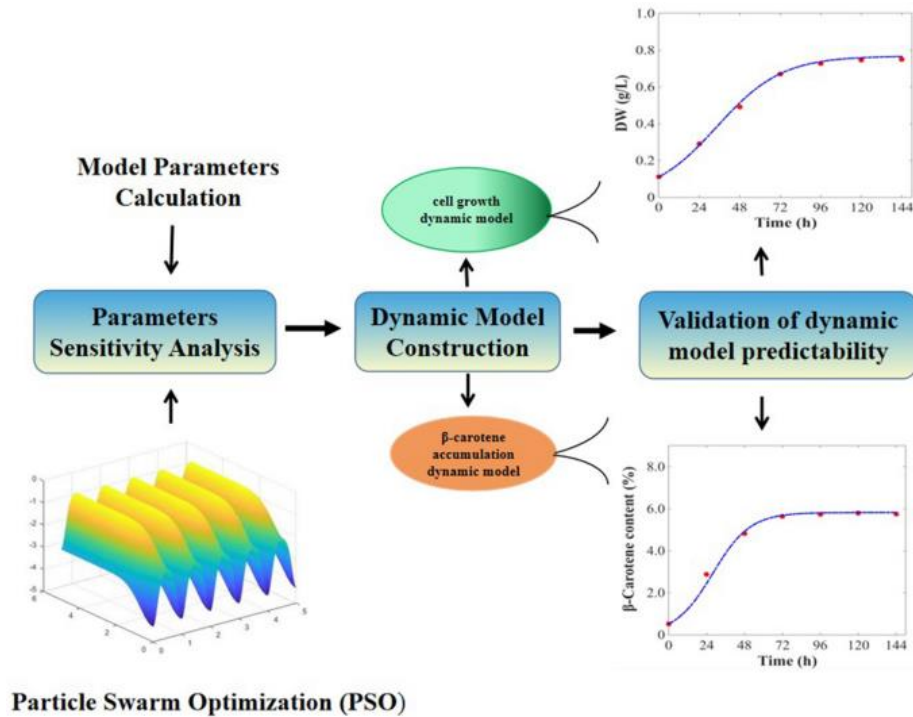


Figure 10. Schéma des étapes successives de culture de *Dunaliella salina* pour l'optimisation de la production de β -carotène (Wang et Li, 2017)

6.1.4 Co-culture avec d'autres microorganismes

Des études récentes ont exploré la co-culture avec des bactéries halophiles comme *Halomonas mongoliensis*, qui peuvent dégrader des composés toxiques tels que le phénol tout en favorisant la croissance de *D. salina* (Zhang et al., 2024). Cette approche améliore l'efficacité globale du système tout en réduisant les coûts liés au traitement des effluents.

6.2 Optimisation des paramètres environnementaux

L'optimisation des paramètres environnementaux est cruciale pour maximiser la productivité, à savoir ;

- Un pH compris entre 7 et 8 favorise une absorption optimale des nutriments (Wang, 2015).
- La température idéale se situe entre 23 °C et 30 °C pour maintenir une croissance rapide (Al-Mhanna et al., 2023)
- Une intensité lumineuse modérée (2000-3000 lx), combinée à une alternance lumière/obscurité (12 h/12 h) stimule à la fois la photosynthèse et l'accumulation de caroténoïdes (Li et Zhang, 2015).

Tableau IV. Paramètres environnementaux optimisés pour la culture de *Dunaliella salina*

Paramètre	Plage optimale	Impact / Rôle
pH	7,0 – 8,0	Facilite l'absorption des nutriments (Wang, 2015)
Température	23 – 30 °C	Favorise une croissance rapide (Al-Mhanna et al., 2023)
Lumière	2000 – 3000 lux	Stimule photosynthèse et accumulation des caroténoïdes (Li et Zhang, 2015)
Cycle lumineux	12 h lumière / 12 h obscurité	Optimise l'activité métabolique et la production de pigments

6.3 Récolte de la biomasse

La récolte de la biomasse de *Dunaliella salina* est une étape essentielle pour exploiter ses composés bioactifs tels que le β -carotène, les lipides et les protéines. Plusieurs techniques sont utilisées pour séparer efficacement les cellules algales du milieu de culture, notamment la floculation, la centrifugation et la filtration. Chaque méthode présente des avantages et des limites en fonction des objectifs industriels et des conditions de culture.

6.3.1 Floculation

La floculation est une méthode économique largement utilisée pour récolter *D. salina*. Elle consiste à provoquer l'agglomération des cellules algales en modifiant le pH du milieu. Par exemple, l'ajout de sodium hydroxide (NaOH) au milieu de culture permet d'augmenter le pH à 11-13, ce qui entraîne une floculation rapide des cellules (Wang, 2015). Cette technique est particulièrement efficace pour les cultures à haute densité, où les cellules algales se regroupent en amas visibles qui peuvent être facilement séparés.

Une fois floculées, les cellules sont transférées dans un bassin où leur pH est ajusté à 7,8-9,3 avant séchage pour produire une poudre d'algue riche en β -carotène (Li et Zhang, 2017).

Cependant, cette méthode peut générer des eaux usées contenant des nutriments résiduels (nitrates et phosphates), nécessitant un traitement supplémentaire pour éviter l'eutrophisation des écosystèmes aquatiques (Tanaka et al., 2024).

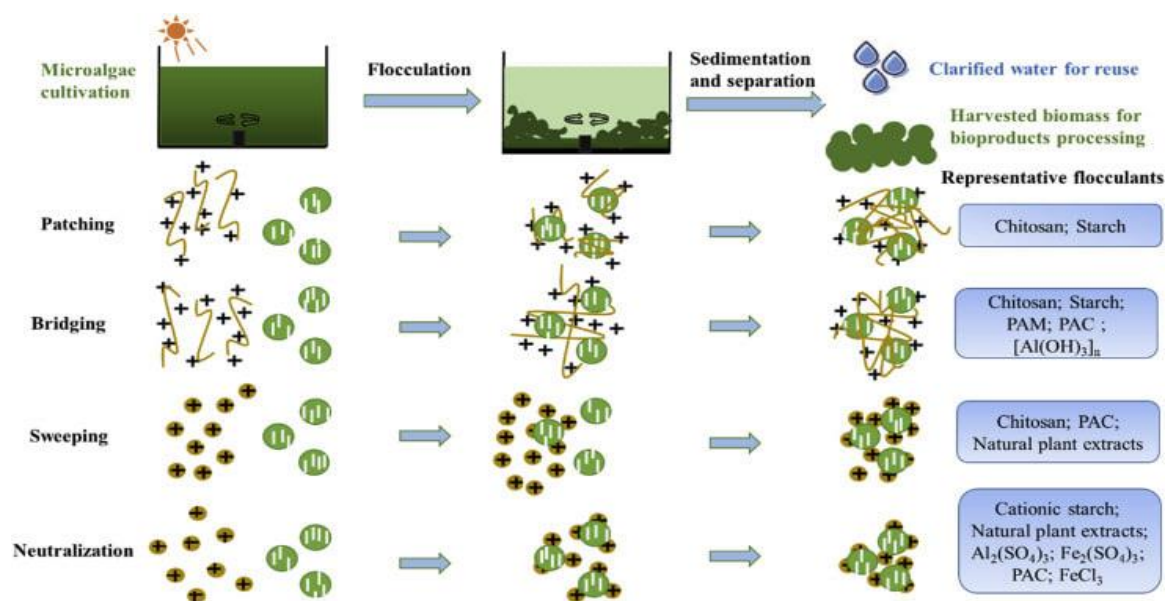


Figure 11. Schéma comparatif des méthodes de floculation appliquées à la récolte des microalgues, incluant la floculation chimique par NaOH (Li et Zhang, 2017)

6.3.2. Centrifugation

La centrifugation est une méthode mécanique qui utilise la force centrifuge pour séparer les cellules algales du milieu liquide. Elle est particulièrement adaptée aux cultures de faible densité où les microalgues sont dispersées dans le milieu (Tanaka, 2024).

Par exemple, une centrifugeuse peut atteindre une efficacité de récolte élevée (>90 %) tout en préservant l'intégrité des composés bioactifs comme le β -carotène et les lipides. Bien que cette technique soit coûteuse en énergie (environ 0,426 kWh/kg de biomasse récoltée), elle garantit une biomasse pure et exempte de contaminants (Tanaka et al., 2024). Elle est donc privilégiée dans les industries alimentaires et pharmaceutiques où la qualité du produit final est cruciale.

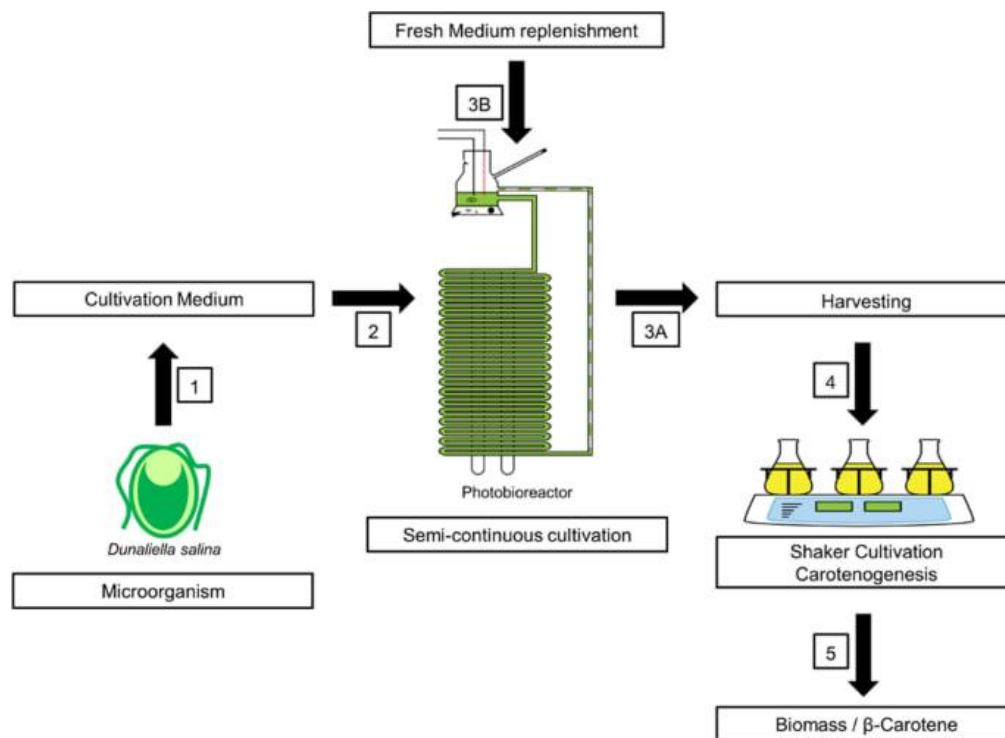


Figure 12. Schéma du procédé semi-continu de centrifugation pour la récolte de *Dunaliella salina*, incluant les étapes de culture, séparation et récupération de la biomasse adapté de Tanaka et al. (2024).

6.3.3. Filtration

La filtration est une méthode simple mais efficace pour récolter *D. salina*, surtout dans les cultures à petite échelle ou expérimentales. Elle utilise des membranes ou des filtres spécifiques capables de retenir les cellules algales tout en laissant passer le liquide de culture.

Par exemple, dans un système de filtration par gravité ou sous pression, la biomasse peut être séparée sans nécessiter d'ajustement chimique du pH (Smith et al., 2015).

Cependant, cette méthode peut devenir moins pratique pour les volumes importants en raison du colmatage fréquent des filtres et du temps nécessaire pour traiter de grandes quantités de liquide.

6.3.2 Techniques avancées : Électrocoagulation

Une méthode innovante appelée électrocoagulation spiralée (SEC) a été récemment développée pour récolter *D. salina* à faible concentration. Cette technique utilise un courant électrique appliqué entre deux électrodes spiralées pour induire l'agglomération des cellules algales.

Des études ont montré que sous un voltage optimal de 20 V pendant 5 minutes, l'efficacité de récolte atteint jusqu'à 74,6 %, tout en réduisant les nutriments résiduels dans les eaux usées de plus de 97 % (Tanaka et al., 2024).

Bien que cette approche soit énergivore, elle offre une solution durable pour minimiser l'impact environnemental des eaux usées issues de la récolte.

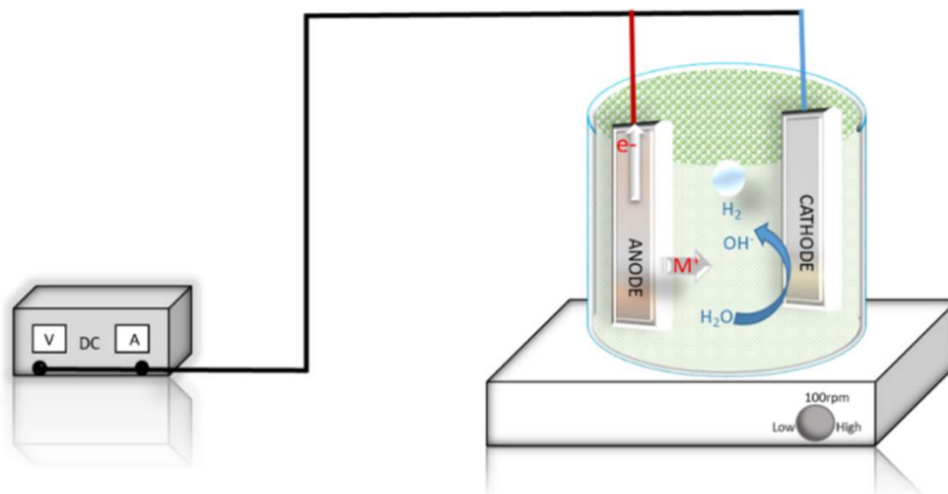


Figure 13. Configuration d'un système d'électrocoagulation utilisant une électrode hélicoïdale pour la récolte des microalgues (Jesse et Hun, 2023)

7 Intérêts biotechnologiques, valorisation et domaines d'applications

Dunaliella salina revêt un intérêt biotechnologique significatif en raison de sa capacité à accumuler divers métabolites sous l'effet de stress environnementaux (salin, lumineux) ou de

limitation nutritive. Cette particularité lui confère des applications potentielles dans de multiples secteurs industriels.

7.1 Domaine agro-alimentaire

Dunaliella salina constitue une ressource nutritionnelle majeure en raison de sa teneur élevée en protéines (jusqu'à 40 % du poids sec) et en acides aminés essentiels, répondant aux besoins des régimes végétariens et véganes (Safi et al., 2017; Barkia et al., 2019).

Son accumulation de β -carotène sous stress environnemental en fait un colorant naturel et une source de provitamine A, utilisée comme complément alimentaire pour lutter contre les carences nutritionnelles (Gleison de Souza Celente et al., 2024).

De plus, sa biomasse agit comme prébiotique, stimulant la croissance des probiotiques intestinaux, ce qui renforce son intérêt en alimentation fonctionnelle.

7.2 Domaine de l'aquaculture

Dans le secteur aquacole, *D. salina* est valorisée pour sa richesse en pigments naturels (β -carotène, astaxanthine) et en acides gras essentiels, améliorant ainsi, la croissance, la survie et la résistance aux maladies des organismes cultivés (Gouveia et Oliveira, 2009). Son utilisation contribue également à la réduction des déchets azotés dans les systèmes d'élevage, optimisant ainsi la qualité de l'eau (Huang et al., 2022).

Les avancées technologiques, telles que les photobioréacteurs, permettent une production à grande échelle adaptée aux besoins croissants de la filière (Borowitzka, 2013).

7.3 Domaine médical, pharmacologique et nutraceutique

Les composés bioactifs de *D. salina*, notamment les caroténoïdes (astaxanthine, lutéine) et les polysaccharides, présentent des propriétés immunomodulatrices, anti-inflammatoires et anticancéreuses (Rosa et al., 2010; Benedetti et al., 2022).

Ces molécules sont exploitées dans les compléments nutraceutiques pour la santé oculaire et cutanée (Nutrimea, 2024).

Par ailleurs, cette microalgue sert de plateforme pour la production de protéines recombinantes, comme l'antigène vaccinal HBsAg (Feng et al., 2024), ouvrant des perspectives prometteuses en biotechnologie médicale.

7.4 Domaine cosmétique

Les extraits de *D. salina* sont intégrés dans les formulations cosmétiques pour leurs propriétés antioxydantes et photoprotectrices, notamment dans les crèmes solaires et anti-âge (Microbewiki, 2025).

Leur capacité à neutraliser les radicaux libres et à protéger la peau contre les UV en fait des ingrédients prisés, d'autant plus que leur production s'inscrit dans une démarche durable (Delattre et al., 2016).

Les innovations en nanoalgosomes permettent une délivrance ciblée des principes actifs, améliorant l'efficacité des produits (Sharma et al., 2020).

7.5 Domaine environnemental

D. salina joue un rôle clé dans la dépollution des eaux hypersalines en absorbant les métaux lourds et les nutriments excédentaires (Feng et al., 2024). Elle contribue également à la fixation du CO₂, participant à l'atténuation des émissions industrielles (Singh et Olsen, 2011).

Son utilisation dans la valorisation des saumures issues du dessalement en fait un outil de gestion durable des ressources hydriques (Rawat et al., 2011).

7.6 Autres applications émergentes

Les lipides neutres (22 % de la biomasse) et le glycérol produits par *D. salina* sont exploités pour la synthèse de biocarburants, offrant une alternative renouvelable aux énergies fossiles (Kumar et al., 2023).

Une approche de bioraffinerie permet une valorisation intégrée, transformant les résidus protéiques en engrais et recyclant le glycérol en pharmacie (Singh et Gu, 2010).

Par ailleurs, son potentiel dans la production de bioplastiques et de molécules recombinantes positionne cette microalgue comme un modèle d'économie circulaire (Wijffels et Barbosa, 2010).

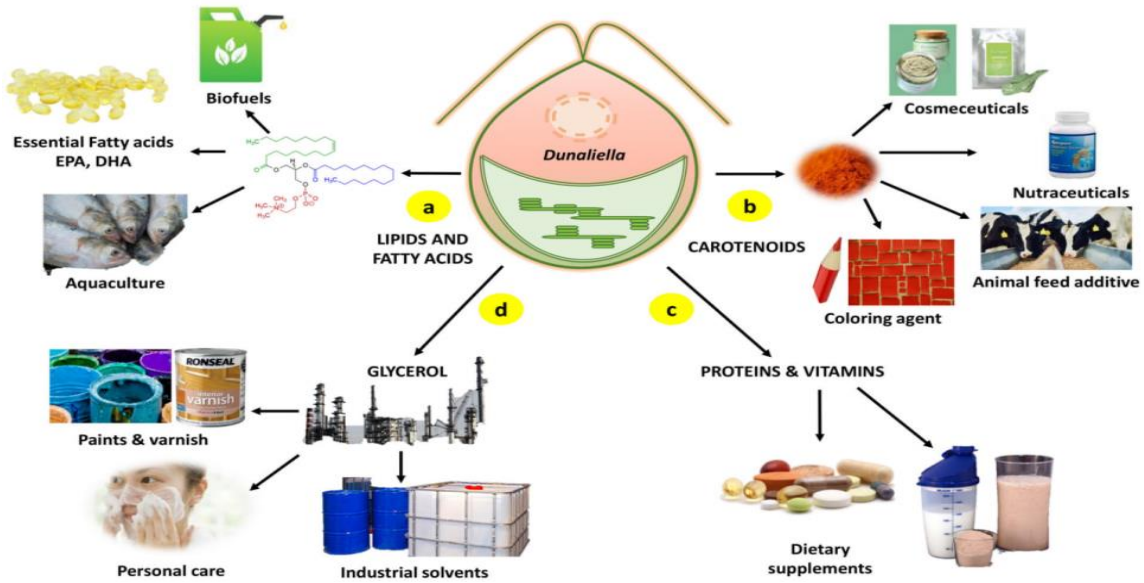


Figure 14. Domaines d'applications et valorisations de *Dunaliella salina*

8 Limites et défis

Malgré son potentiel élevé, la production commerciale de *Dunaliella salina* reste limitée par sa faible productivité en termes de biomasse et par le coût élevé des systèmes de culture nécessaires pour maximiser la production de caroténoïdes (Mouradi et al., 2009). Des recherches sont actuellement menées pour optimiser ses conditions de culture afin d'améliorer son rendement économique.

CHAPITRE II
MATÉRIELS & MÉTHODES

I. Matériels

1 Matériels biologiques

Le seul matériel biologique utilisé pour ce travail, et qui représente le centre de ce dernier, se résume en des échantillons d'eau issus de sebkha, contenant des microorganismes halophiles, dont la micro algue *Dunaliella* sp., ainsi que les échantillons d'eau de mer pour la préparation des milieux de culture.

2 Matériels non biologiques

Tableau V. Liste des matériels non-biologiques et des réactifs utilisés pour la culture

Outils et appareillages	Produits et réactifs
Balance de précision	L'huile à immersion
Barreaux magnétiques	Eau du robinet
Béchers (25 ml, 50 ml, 100 ml)	Eau distillée
Agitateur magnétique chauffant	Eau de mer
Congélateur	NaCl
Etuve (MEMMERT UM 600)	MgSO ₄
Bec bunsen	CaCl ₂
Membranes de filtration (0.45µm)	KNO ₃
Papier absorbant	NaHCO ₃
Lame et lamelle	C ₄ H ₁₁ NO ₃
Microscope optique	KH ₂ PO ₄
Pipettes graduées	
Erlenmeyers	
Poire	
Pinces	
Rampe de filtration	
Conductimètre	
PH-mètre	
Dessiccateur	
Lyophilisateur	

II. Méthodes

1 Échantillonnage

1.1 Échantillonnage de l'espèce

L'échantillonnage a été réalisé en prenant toutes les précautions nécessaires pour garantir la qualité et la représentativité des prélèvements. Avant l'intervention sur le site, des gants et des bottes ont été utilisés afin d'assurer une manipulation hygiénique des échantillons et de se protéger des conditions parfois difficiles du terrain.

Sur place, des prélèvements ont été effectués dans plusieurs zones de la sebkha, en variant les emplacements pour couvrir la diversité du milieu. Certains échantillons ont été prélevés dans des zones à forte concentration saline (présence de croûtes salines), tandis que d'autres ont été collectés dans des secteurs plus riches en eau. À chaque point de prélèvement, la profondeur a été variée afin d'obtenir des échantillons représentatifs de la colonne d'eau et des différentes micro-niches écologiques.

Les échantillons d'eau ont été recueillis dans des récipients stériles, puis immédiatement transférés dans des bacs de 5 litres préalablement stérilisés pour éviter toute contamination. Ces bacs ont ensuite été étiquetés avec soin et transportés au laboratoire dans des conditions optimales pour préserver l'intégrité des microalgues jusqu'aux étapes d'isolement et de culture.

1.2 Échantillonnage de l'eau de mer

L'échantillonnage a été réalisé en prenant toutes les précautions nécessaires pour garantir la qualité et la représentativité des prélèvements. Avant l'intervention sur le site, des gants et des bottes ont été utilisés pour assurer une manipulation hygiénique et une protection face aux conditions marines.

Des récipients stériles de 5 litres ont été employés pour collecter les échantillons d'eau de mer, évitant toute contamination externe.

Les prélèvements ont été effectués à marée basse, à différentes profondeurs (0,5 m à 2 m) pour capter la variabilité verticale de la colonne d'eau. Les échantillons ont été immédiatement réfrigérés à 4 °C et transportés au laboratoire dans les 24 heures pour préserver l'intégrité microbiologique.

1.3 Zones d'échantillonnage

Les échantillons ont été collectés dans deux zones principales. La première concerne la sebkha Ezzemoul, un milieu hypersalin naturel, riche en microalgues halophiles telles que *Dunaliella salina*.

1.3.1 Au niveau de la sebkha Ezzemoul

L'échantillonnage a été réalisé au niveau de la sebkha Ezzemoul; un lac hypersalin situé dans la région d'Ain M'lila, dans la wilaya d'Oum El Bouaghi, en Algérie. Ce site représente un environnement extrême caractérisé par une forte salinité, des variations importantes de température et un pH neutre à légèrement alcalin, conditions qui favorisent le développement d'une flore microbienne halophile adaptée (Kharroub et al., 2007).

La sebkha est une zone humide saline typique du climat aride, avec un important encroûtement de sel sur ses berges et une végétation clairsemée composée principalement de Chénopodiacées, qui jouent un rôle écologique important dans la lutte contre l'érosion et la fixation du sel (Ramsar, 2005).

Géographiquement, la sebkha Ezzemoul est localisée aux coordonnées 35°52'N de latitude et 06°32'E de longitude, à environ 17 km au sud de la ville d'Ain M'lila (Kharroub, 2007). Cette position géographique lui confère des conditions climatiques semi-arides à arides, avec des températures pouvant varier de 5 à 45 °C selon les saisons, et une salinité pouvant dépasser 300 g/L, créant un milieu propice à la croissance d'organismes halophiles extrêmes, notamment des microalgues du genre *Dunaliella* (Boulahrouf et al., 2006; Kharroub et al., 2007).

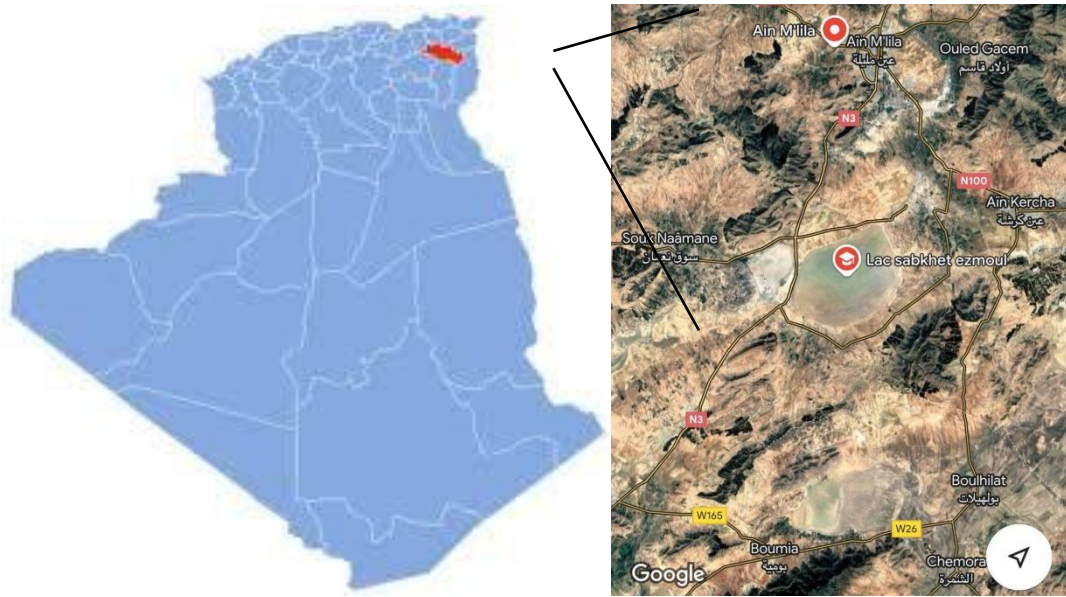


Figure 15. La localisation de sebkha Ezzemoul à Ain M'lila (Google Maps)

Plusieurs espèces halophiles, dont *Dunaliella viridis* et *Dunaliella parva*, ont été identifiées dans ce milieu, témoignant de la diversité microbienne spécifique aux conditions extrêmes de la sebkha (Kharroub, 2007).

La collecte des échantillons a été réalisée directement dans les eaux hypersalines de la sebkha, à différentes profondeurs et points représentatifs, afin de capturer la diversité microbienne présente. Les échantillons ont été conservés à basse température et transportés rapidement au laboratoire pour isolement et culture des microalgues, notamment *Dunaliella salina* (Kharroub et al., 2007).

Cette zone d'échantillonnage est particulièrement intéressante pour l'étude des microalgues halophiles en raison de ses conditions physico-chimiques extrêmes et de sa biodiversité microbienne, offrant un cadre naturel idéal pour l'isolement de souches robustes et productrices de biomolécules d'intérêt telles que le β -carotène (Kharroub et al., 2006).

1.3.2 Station de dessalement de Palm Beach, Staoueli (Alger)

La zone d'échantillonnage cible le périmètre côtier adjacent à la station de dessalement de Palm Beach, située dans la commune de Staoueli (36°45'12"N, 2°53'24"E). Cette station, opérationnelle depuis 2021 et étendue en 2024, produit 7 500 m³/jour d'eau potable via le procédé d'osmose inverse, générant des rejets de saumures concentrées qui modifient localement la salinité et la composition ionique du milieu marin.



Figure 16. Cartographie de la zone d'échantillonnage de *Dunaliella salina* Palm beach, Alger

Les prélèvements ont été effectués à moins de 500 m des diffuseurs de rejet des saumures, où la salinité atteint 45–50 g/L (contre 36-38 g/L en milieu naturel).

Ce site a été ciblé car il offre un modèle d'écosystème marin anthropisé, idéal pour étudier l'adaptation des microalgues comme *D. salina*, adaptée aux conditions de salinité élevée.

1.4 Évaluation de l'état de l'échantillon

Dès leur réception au laboratoire, les échantillons ont fait l'objet d'une observation microscopique afin d'évaluer leur intégrité. Cette analyse visait à caractériser la présence et la diversité des microalgues ainsi que des autres micro-organismes aquatiques, tout en vérifiant spécifiquement l'occurrence de l'espèce cible, *Dunaliella salina*, avant de procéder aux étapes ultérieures d'isolement et de culture.

1.5 Conservation des échantillons

Les échantillons ont été conservés dans leurs bacs stériles sans subir aucun traitement particulier. Ils ont été laissés dans les conditions naturelles, sans ajout de conservateur ni modification de température ou de composition, afin de préserver au maximum la structure et la composition microbienne initiale du milieu d'origine. Cette approche a permis d'éviter toute altération des communautés microalgales originellement présentes dans les échantillons.

2 Filtration

La filtration constitue une étape fondamentale, visant à concentrer les microalgues initialement présentes dans les échantillons prélevés en milieux hypersalins, en les retenant sur une membrane tout en éliminant les particules indésirables.

2.1 Protocole de filtration

La filtration a été réalisée au moyen d'une rampe de filtration multitubes équipée d'entonnoirs pourvus de membranes en cellulose, dont la taille de pores (0,45 μm) a été spécifiquement choisie pour optimiser la rétention des cellules de *Dunaliella salina*. L'ensemble du processus a été conduit dans le strict respect des protocoles d'asepsie.

Un système de vide connecté à la rampe permet une aspiration efficace du milieu liquide à travers les filtres, offrant un avantage significatif en termes de rapidité par rapport aux méthodes de filtration gravitaire traditionnelle. Aussi, cette approche méthodologique a été choisie pour minimiser les stress mécaniques susceptibles d'affecter leur viabilité ultérieure.



Figure 17. Rampe de filtration

2.2 Transfert des microalgues vers les milieux de culture

Après filtration, les microalgues retenues sur les filtres sont collectées par lavage ou grattage délicat, puis transférées dans des flacons contenant des milieux de culture préparés au

préalable. L'effet de ces milieux sur la croissance des microalgues fera l'objet d'une étude ultérieure.

L'inoculation a été réalisée en conditions aseptiques afin de prévenir toute contamination bactérienne ou fongique.

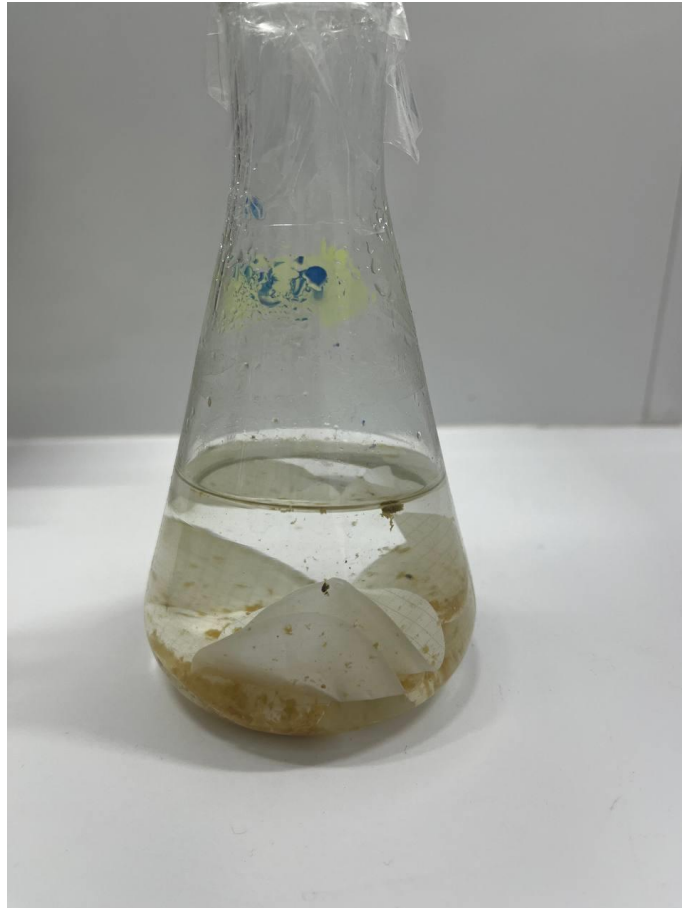


Figure 18. Transfert des microalgues vers les milieux de culture

3 Etude des paramètres physico-chimiques de croissance

Cette phase a pour but de déterminer les paramètres physico-chimiques critiques assurant la viabilité et la croissance de *Dunaliella salina* dans un système de culture expérimentale artificielle.

Pour chaque essai, deux types de cultures ont été comparés :

- Culture témoin (non filtrée) : Échantillon brut d'eau de Sebka contenant la microalgue étudiée.

- Culture filtrée : Microalgue obtenue après filtration de l'échantillon initial et mise en culture dans un milieu simplifié, composé de chlorure de sodium (NaCl) et de bicarbonate de sodium (NaHCO₃).

3.1 Impact de la salinité sur la croissance

L'évaluation de l'impact de la salinité sur le développement de la microalgue halophile *D. salina* a été effectuée suivant une étude comparative des différentes configurations expérimentales suivantes ;

- Culture témoin (non filtrée) : Échantillon brut d'eau de Sebka contenant la microalgue étudiée, avec une salinité naturel moyenne d'environ 15 à 20 %.
- Culture filtrée avec modulation de la salinité : Microalgue obtenue après filtration de l'échantillon initial et mise en culture dans des milieux simplifiés, composé de NaHCO₃ et diverses concentrations en NaCl (2 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 % et 30 %).

Permettant une caractérisation exhaustive des seuils de tolérance en salinité favorables au développement et à la survie de *D. salina*, cette étape constitue la base des essais ultérieurs.

Le suivi des cultures comportait une étude macroscopique (la coloration du milieu; vert ou rose orangé, la turbidité), ainsi qu'une étude au niveau microscopique (la densité cellulaire, la mobilité, la morphologie et la pigmentation des cellules).

3.2 Impact de l'origine de la lumière sur la croissance

L'influence de l'origine de la lumière sur la croissance de *Dunaliella salina* a été étudiée, en raison de son rôle essentiel dans la photosynthèse, fournissant l'énergie nécessaire à la conversion du CO₂ en biomasse.

Deux configurations expérimentales ont été comparées :

- Une exposition en extérieur à la lumière naturelle, reproduisant les conditions écologiques de l'espèce avec des variations d'intensité et de spectre liées au cycle jour/nuit,
- Une culture en intérieur sous éclairage artificiel contrôlé, permettant une régulation précise de l'intensité et de la photopériode.

Dans les deux cas, les cultures étaient agitées pour homogénéiser le milieu et uniformiser l'exposition lumineuse.

Le suivi des cultures comportait une étude macroscopique (la coloration du milieu; vert ou rose orangé, la turbidité), ainsi qu'une étude au niveau microscopique (la densité cellulaire, la mobilité et la morphologie et pigmentation des cellules).

3.3 Impact de la température sur la croissance

Pour évaluer l'impact de la température sur la croissance de *Dunaliella salina*, une approche comparative a été adoptée mettant en œuvre deux dispositifs expérimentaux distincts, à savoir ;

- Le premier essai a été conduit en extérieur, dans des conditions naturelles correspondant à la saison hivernale. Durant cette période, la température ambiante était relativement basse, avec des fluctuations quotidiennes pouvant descendre jusqu'à environ 10-12 °C, voire moins pendant les nuits les plus froides.
- Le second essai a été réalisé dans la ferme aquacole de notre établissement, dans une salle équipée de radiateurs assurant un chauffage constant. Dans ce contexte, la température ambiante était nettement plus élevée et stable, oscillant autour de 22-25 °C.

Le suivi des cultures comportait une étude macroscopique (la coloration du milieu; vert ou rose orangé, la turbidité), ainsi qu'une étude au niveau microscopique (la densité cellulaire, la mobilité et la morphologie et pigmentation des cellules).

3.4 Impact de l'aération sur la croissance

Afin d'évaluer l'impact de l'aération sur la culture de *Dunaliella salina* deux configurations expérimentales ont été mises en place.

- Dans le premier cas, les flacons Erlenmeyer ont été laissés partiellement ouverts, c'est-à-dire munis de couvercles perforés. Ces couvercles, percés de petits trous, permettaient un échange d'air limité avec l'environnement extérieur.
- Dans le second cas, les flacons Erlenmeyer ont été complètement fermés avec des bouchons stériles, empêchant tout échange direct avec l'air extérieur.

Les flacons ont été placés dans des conditions identiques de température et d'éclairage, et le suivi des cultures comportait une étude macroscopique (la coloration du milieu; vert ou rose orangé, la turbidité), ainsi qu'une étude au niveau microscopique (la densité cellulaire, la mobilité et la morphologie et pigmentation des cellules).

3.5 Impact de l'agitation

L'effet de l'agitation sur le développement de *Dunaliella salina* a été évalué selon une approche comparative impliquant deux conditions expérimentales distinctes;

- Culture avec agitation : Les erlenmeyers ont été maintenus sous agitation constante.
- Culture statique : Les erlenmeyers n'ont été soumis à aucune agitation.

Les flacons ont été placés dans des conditions identiques de température et d'éclairage, et le suivi des cultures comportait une étude macroscopique (la coloration du milieu ; vert ou rose orangé, la turbidité), ainsi qu'une étude au niveau microscopique (la densité cellulaire, la mobilité et la morphologie et pigmentation des cellules).

4 Milieux de culture

La formulation d'un milieu de culture adapté à la croissance de *Dunaliella salina* a été réalisée de manière progressive, selon une approche méthodique fondée, en partie, sur les résultats de l'analyse préalable de l'effet de la salinité sur sa croissance (section 3.1).

Ce processus d'optimisation s'est déroulé en plusieurs phases successives :

- La phase initiale : élaboration milieu de culture simple
- La phase d'élaboration d'un milieu de culture optimisé

4.1 La phase initiale : élaboration milieu de culture simple

Cette phase a consisté en la formulation d'un milieu de culture minimaliste, répondant aux exigences physiologiques fondamentales de *Dunaliella salina*. En tant que micro algue halophile, cette espèce présente des besoins nutritionnels spécifiques, notamment : une plage de salinité optimale correspondant à son écologie naturelle, et un pH alcalin conforme à ses exigences métaboliques.

Après inoculation, les milieux préparés ont été maintenus à température ambiante, stabilisée entre 20 et 25 °C, une plage thermique correspondant aux exigences physiologiques de cette espèce halophile. Un éclairage naturel suivant le cycle nyctéméral a été appliqué pour permettre une activité photosynthétique optimale, tandis qu'une aération continue a été assurée afin d'homogénéiser le milieu et de favoriser les échanges gazeux essentiels au métabolisme algal.

Le suivi des cultures comportait une étude macroscopique (la coloration du milieu; vert ou rose orangé, la turbidité), ainsi qu'une étude au niveau microscopique (la densité cellulaire, la mobilité et la morphologie et pigmentation des cellules).

4.2 La phase d'élaboration d'un milieu de culture optimisé

Cette phase expérimentale a été conduite en s'appuyant sur les données acquises lors de l'étude préliminaire des paramètres physico-chimiques influençant la croissance, ainsi que sur les observations issues de la première étape de caractérisation.

Dans l'objectif d'élaborer un milieu de culture optimal pour *D. salina*, une analyse comparative a été menée évaluant la productivité en biomasse de trois formulations distinctes:

- **Milieu synthétique (M1)** : Eau distillée enrichie avec des produits chimiques essentiels, notamment du bicarbonate de sodium (NaHCO_3), du nitrate de sodium (NaNO_3) et du phosphate dipotassique (K_2HPO_4), pour garantir un apport adéquat en carbone, azote et phosphore .
- **Milieu semi-synthétique à base d'eau de mer (M2)** : Eau de mer enrichie avec les mêmes additifs chimiques pour simuler des conditions plus proches du milieu naturel tout en augmentant l'efficacité des échanges ioniques .
- **Milieu naturel 100 % d'eau de mer (M3)** : Eau de mer non modifiée, utilisée comme témoin pour évaluer la capacité de *Dunaliella salina* à survivre et croître en conditions naturelles, sans ajout de nutriments externes.



Figure 19. Les milieux de culture réalisés (M1, M2, M3).

Chaque milieu a été inoculé avec la biomasse algale préalablement collectée et filtrée, assurant ainsi une concentration initiale homogène. Les cultures ont été réparties dans des flacons Erlenmeyer stériles, maintenus en incubation pendant une période prolongée de deux mois.

Le suivi des cultures comportait une étude macroscopique (la coloration du milieu; vert ou rose orangé, la turbidité), ainsi qu'une étude au niveau microscopique (la densité cellulaire, la mobilité et la morphologie et pigmentation des cellules).

5 Étude comparative M1, M2, M3; évaluation de l'efficacité des milieux de culture sur la croissance de *Dunaliella salina*

Afin de comparer la productivité des différents milieux de culture, les biomasses algales obtenues pour chaque condition expérimentale ont été récoltées, puis soumises à un procédé de lyophilisation pour élimination complète de l'eau. Les échantillons secs ont ensuite été pesés.

5.1 Récolte de la biomasse

Une fois les cultures arrivées à maturité ou au stade souhaité selon les objectifs expérimentaux, les échantillons ont été récoltés par centrifugation ou filtration douce pour séparer la biomasse liquide du milieu de culture.

Puis les biomasses obtenues, à partir de chaque milieu de culture, ont été rapidement transférées dans des contenants stériles, pour éviter toute contamination ou dégradation avant le séchage.

5.2 Séchage par lyophilisation

Les biomasses obtenues après culture dans chacun des 3 milieux (M1, M2, M3) ont été réparties en portions homogènes avant d'être congelées à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 24 heures. Cette congélation rapide assure la formation d'une glace fine, limitant la formation de cristaux destructeurs.

Ensuite, les contenants ont été placés dans un lyophilisateur sous vide, avec une température de sublimation contrôlée entre $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ et $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, pendant une durée adaptée (généralement 48 à 72 heures) pour garantir un séchage optimal.



Figure 20. Lyophilisation ($-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ et $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$)

5.3 Évaluation du rendement en biomasse

Après la lyophilisation, les contenants ont été pesés avec une balance analytique de haute précision, afin de déterminer la masse sèche.

6 Évaluation de l'accumulation de β -carotène chez *D. salina* sous différents gradients de NaCl

Dans le cadre de l'optimisation de la culture de *Dunaliella salina*, une expérimentation a été menée pour évaluer l'effet du stress salin sur l'accumulation de β -carotène.

Les milieux de culture préalablement optimisés ont été soumis à des concentrations croissantes de NaCl (5, 10, 15, 20, 25 et 30 %), afin d'induire un stress osmotique et de déterminer à quel seuil de salinité la microalgue répond par une biosynthèse accrue de β -carotène, un mécanisme de photoprotection bien documenté chez cette espèce, identifiant ainsi la plage de salinité optimale pour maximiser l'accumulation de β -carotène, tout en maintenant une croissance cellulaire viable.

Le suivi des cultures comportait une étude macroscopique (la coloration du milieu; vert ou rose orangé, la turbidité), ainsi qu'une étude au niveau microscopique (la densité cellulaire, la mobilité et la morphologie et pigmentation des cellules).

7 Conservation

Afin de maintenir un environnement anhydre et d'éviter, par conséquent, toute réhydratation ou dégradation des biomolécules sensibles à l'humidité ambiante, et assurer ainsi une stabilité pondérale et biochimique des échantillons jusqu'aux analyses ultérieures, les échantillons de biomasse ont été immédiatement placés dans un dessiccateur contenant un agent desséchant (silice gel ou tamis moléculaire), après lyophilisation et pesée.

CHAPITRE III
RÉSULTATS & DISCUSSION

Résultats et discussion

1 Evaluation de l'état de l'échantillon et conservation

La conservation des échantillons prélevés dans la sebkha Ezzemoul a été effectuée dans des bacs stériles, sans ajout de conservateurs ni altération des conditions initiales, afin de préserver la structure cellulaire et la composition microbienne originelles, comme l'a confirmé l'observation microscopique lors de la réception. Cette méthode est cruciale pour éviter la lyse cellulaire et les modifications du microbiome, qui pourraient fausser les analyses ultérieures. L'absence de conservateurs chimiques maintient la viabilité des microalgues, une condition essentielle pour les étapes d'isolement et de culture, comme le souligne Andersen (2005).



Figure 21. Photo des jerricanes d'eau de sebkha échantillonnée

Par ailleurs, le maintien des conditions naturelles permet de préserver les interactions microbiennes initiales, lesquelles peuvent influencer la croissance et la productivité des microalgues (Borowitzka, 2013). La résistance de *Dunaliella salina* dans ces milieux hypersalins constitue un avantage majeur pour le développement de procédés aquacoles durables adaptés aux environnements arides, tels que ceux rencontrés en Algérie (Kharroub et

al., 2007). Ainsi, cette étape de conservation garantit un point de départ fiable pour la culture expérimentale et la production d'une biomasse de qualité.

Quant à la qualité de l'échantillon, aucun signe de contamination bactérienne ou fongique n'a été détecté, pouvant être expliqué par le taux de salinité naturellement élevé de l'eau échantillonnée.

Concernant la présence de *Dunaliella salina* dans l'échantillon, plusieurs observations microscopiques ont été effectuées, et les cellules de la microalgues été vraiment rares, décolorées, de très petite taille, à peine visibles et peu mobiles.

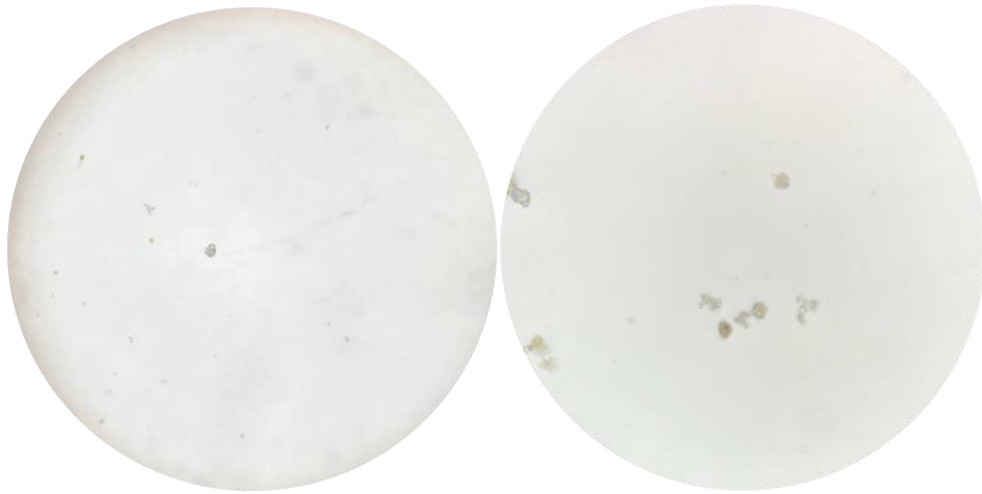


Figure 22. Observations microscopiques des échantillons dès leur arrivée en laboratoire (T0), objectif $\times 40$.

2 Filtration et transfert vers les milieux de culture

La filtration sous vide a été réalisée à l'aide de membranes de $0,45 \mu\text{m}$, permettant de concentrer efficacement les microalgues tout en éliminant les particules indésirables. Les cellules de *D. salina* ont été récupérées par lavage doux, puis transférées dans des milieux de culture stériles. L'asepsie a été rigoureusement respectée, limitant la contamination bactérienne ou fongique, ce qui est fondamental pour la réussite des cultures.



Figure 23. Transfert de la biomasse vers les milieux de culture après filtration

Cette méthode est largement reconnue pour sa capacité à fournir des inocula homogènes et viables, tout en minimisant le stress mécanique sur les cellules (Andersen, 2005; Borowitzka, 2013). De ce fait, c'est une étape clé dans l'optimisation des cultures ou pour la chaîne de production, assurant la qualité initiale de la biomasse.

3 Etude des paramètres physico-chimiques de croissance

Les résultats obtenus lors de l'étude des paramètres physico-chimiques de croissance de *Dunaliella salina* mettent en évidence des différences significatives entre les cultures témoins non filtrées et les cultures filtrées en milieu simplifié.

3.1 Impact de la salinité sur la croissance

L'évaluation de l'impact de la salinité sur la croissance de *Dunaliella salina* a montré que la microalgue tolère une large gamme de concentrations en NaCl, de 2 % à 30 %. La croissance optimale a été observée entre 15 % et 20 % de salinité, correspondant à la salinité naturelle de l'eau de Sebka utilisée dans la culture témoin.

À des salinités inférieures (2 %, 5 %, 10 %) ou supérieures (25 %, 30 %), la croissance cellulaire était réduite, accompagnée de modifications visibles au niveau macroscopique, notamment une coloration moins intense et une turbidité diminuée.

Microscopiquement, les cellules présentaient une mobilité réduite et une pigmentation moindre aux concentrations extrêmes de salinité, tandis que leur morphologie restait globalement intacte dans la plage optimale.

Ces résultats confirment la capacité remarquable de *Dunaliella salina* à s'adapter à des conditions salines extrêmes, avec une tolérance étendue allant de faibles concentrations

jusqu'à 30 % de NaCl, ce qui est cohérent avec les observations de Volcani (1944) et les données plus récentes Smith et al. (2015).

La croissance optimale autour de 15-20 % de salinité correspond à la plage naturelle de son habitat, la Sebkhah, et est en accord avec les travaux de Revist et al. (2017) qui rapportent une croissance maximale et une production accrue de biomasse dans cette fourchette.

La diminution de la croissance aux conditions extrêmes de salinité s'explique par le stress osmotique, qui affecte la mobilité et la pigmentation des cellules (Borowitzka & Siva, 2007).

Par ailleurs, la capacité de *Dunaliella salina* à modifier sa morphologie cellulaire en réponse à des conditions salines non optimales, notamment par la formation de formes de résistance comme les aplanospores, a été décrite par Borowitzka & Huisman (1993). Ces mécanismes d'adaptation permettent à la microalgue de survivre dans des milieux fluctuants et hostiles.

Enfin, la modulation de la salinité dans les milieux simplifiés, utilisés en culture filtrée constitue une base essentielle pour optimiser les conditions de croissance et la production de molécules actives d'intérêt (Richmond, 2004; Oren, 2005).

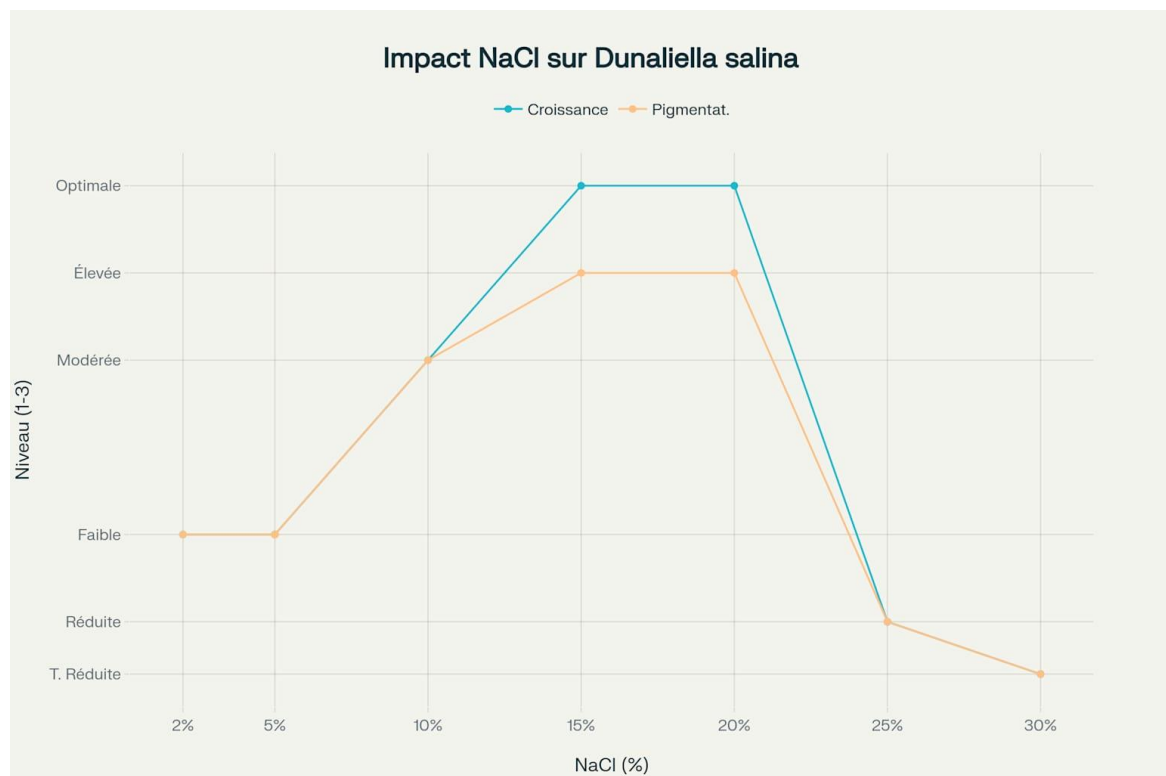


Figure 24. Impact de la salinité sur la croissance et la pigmentation de *Dunaliella salina*

3.2 Impact de l'origine de la lumière sur la croissance

L'étude de l'impact de l'origine de la lumière sur la croissance de *Dunaliella salina* a révélé des différences notables entre les cultures exposées à la lumière naturelle en extérieur et celles cultivées sous éclairage artificiel en intérieur.

Les cultures en lumière naturelle ont montré une croissance plus rapide, avec une coloration verte plus intense et une turbidité élevée. Microscopiquement, la densité cellulaire était plus élevée, avec des cellules mobiles et bien pigmentées.

En revanche, les cultures sous éclairage artificiel présentaient une croissance plus lente, une coloration moins prononcée et une densité cellulaire moindre, bien que la morphologie cellulaire soit restée normale, avec une mobilité conservée.

Ces résultats confirment l'importance cruciale de la lumière naturelle dans la croissance optimale de *Dunaliella salina*. La lumière naturelle, avec ses variations d'intensité et de spectre liées au cycle jour/nuit, semble favoriser une meilleure photosynthèse et une production accrue, ce qui est en accord avec les observations de Borowitzka (1999) et de Ben-Amotz et al. (2009). La lumière naturelle offre une gamme spectrale complète qui stimule la synthèse pigmentaire et la croissance cellulaire, contrairement à l'éclairage artificiel souvent limité en spectre (Richmond, 2004).

De plus, la photopériode et les fluctuations naturelles de l'intensité lumineuse jouent un rôle dans la régulation des cycles biologiques de *D. salina*, ce qui peut expliquer la meilleure performance des cultures en extérieur (Oren, 2005).

Cependant, l'éclairage artificiel permet un contrôle précis des paramètres lumineux, utile pour des études expérimentales ciblées, bien que les conditions restent moins favorables à la production maximale de biomasse et de pigments (Sánchez et al., 2018).

Ces résultats soulignent l'importance d'adapter les conditions lumineuses aux objectifs de culture, notamment pour la production industrielle de composés à haute valeur ajoutée, où un compromis entre contrôle et performance peut être recherché (Borowitzka & Siva, 2007).

3.3 Impact de l'aération sur la croissance

L'évaluation de l'impact de l'aération sur la croissance de *Dunaliella salina* a montré que les cultures dans les flacons partiellement ouverts, munis de couvercles perforés, présentaient une croissance plus importante comparée aux flacons complètement fermés.

Macroscopiquement, le milieu des flacons aérés affichait une coloration verte plus intense et une turbidité plus élevée, signe d'une biomasse accrue. Au niveau microscopique, la densité cellulaire était significativement plus élevée, avec des cellules mobiles, bien pigmentées et présentant une morphologie normale.

En revanche, les cultures dans les flacons fermés ont montré une croissance ralentie, une coloration moins prononcée et une densité cellulaire réduite, bien que les cellules restaient viables.

Ces résultats soulignent l'importance de l'aération dans la culture de *Dunaliella salina*, notamment pour assurer un apport suffisant en dioxygène et en dioxyde de carbone, essentiels à la photosynthèse et à la respiration cellulaire. La meilleure croissance observée dans les flacons partiellement ouverts est en accord avec les études récentes de Zhang et al. (2021), qui démontrent que l'aération améliore l'échange gazeux, favorisant ainsi la production de biomasse et la synthèse de pigments chez les microalgues halophiles. De plus, l'aération contribue à l'homogénéisation du milieu, évitant la formation de gradients de nutriments et de gaz, ce qui optimise les conditions de croissance (Liu et al., 2023).

À l'inverse, l'absence d'aération dans les flacons fermés limite l'échange gazeux, ce qui peut entraîner une accumulation de CO₂ ou une diminution de l'oxygène dissous, impactant négativement la photosynthèse et la viabilité cellulaire (Wang et al., 2022). Ces observations corroborent les conclusions de Pérez et al. (2020), qui recommandent une aération contrôlée pour maximiser la productivité des cultures microalgales en milieu artificiel.

Par conséquent, l'aération constitue un paramètre clé à maîtriser pour optimiser la croissance et la production de composés d'intérêt chez *Dunaliella salina*, particulièrement dans des systèmes de culture fermés ou semi-fermés.

3.4 Impact de l'agitation

L'évaluation de l'impact de l'agitation sur la croissance de *Dunaliella salina* a montré que les cultures maintenues sous agitation constante présentaient une croissance nettement supérieure à celles en condition statique.

Macroscopiquement, les milieux agités affichaient une coloration verte plus intense et une turbidité plus élevée, témoignant d'une biomasse accrue. Microscopiquement, la densité cellulaire était significativement plus élevée dans les cultures agitées, avec des cellules bien pigmentées, mobiles et présentant une morphologie saine.

En revanche, les cultures statiques ont montré une croissance plus lente, une coloration moins prononcée et une densité cellulaire réduite, bien que les cellules soient restées viables.

Ces résultats confirment que l'agitation joue un rôle clé dans le développement optimal de *Dunaliella salina*. L'agitation favorise l'homogénéisation du milieu de culture, assurant une meilleure distribution des nutriments, du dioxyde de carbone et de la lumière, ainsi qu'une évacuation efficace des déchets métaboliques (Zhao et al., 2022). Cette meilleure circulation améliore la photosynthèse et la croissance cellulaire, comme l'ont montré récemment Chen et al. (2023), qui ont observé une augmentation significative de la biomasse et de la production de pigments chez *D. salina* sous agitation contrôlée.

À l'inverse, les cultures statiques peuvent souffrir de gradients de concentration en nutriments et en gaz dissous, limitant la croissance et entraînant une moindre production pigmentaire (López et al., 2021). De plus, l'absence d'agitation peut favoriser la sédimentation des cellules, réduisant leur exposition à la lumière et donc leur activité photosynthétique (Martínez et al., 2020).

Ainsi, l'agitation apparaît comme un paramètre essentiel à optimiser dans les systèmes de culture de *Dunaliella salina* pour maximiser la productivité, en particulier dans les applications industrielles où la qualité et la quantité de biomasse sont déterminantes.

4 Milieux de culture

La formulation d'un milieu de culture adapté constitue une étape fondamentale pour assurer la croissance optimale de *Dunaliella salina*.

En s'appuyant sur les résultats obtenus lors de l'étude de l'impact de la salinité (section 3.1), un processus progressif d'élaboration a été mis en place, comprenant une phase initiale de développement d'un milieu simple, suivie d'une phase d'optimisation visant à enrichir ce milieu pour maximiser la viabilité et la productivité de la microalgue.

Cette approche méthodique permet d'identifier les composantes essentielles et les conditions physico-chimiques favorables à la culture de *D. salina* dans un système expérimental contrôlé.

4.1 La phase initiale : élaboration milieu de culture simple

Lors de la phase initiale d'élaboration du milieu de culture simple, *Dunaliella salina* a montré une croissance satisfaisante dans le milieu minimaliste formulé.

Macroscopiquement, la coloration du milieu devenait de plus en plus verte au fil du temps, et la turbidité a également augmenté, témoignant d'une augmentation de la biomasse.

Au niveau microscopique, la densité cellulaire a augmenté régulièrement, avec des cellules présentant une mobilité normale, une morphologie saine et une pigmentation caractéristique.

Ces observations suggèrent que le milieu simple répondait aux besoins physiologiques fondamentaux de *D. salina* pour assurer sa viabilité et son développement.

Les résultats obtenus lors de cette phase initiale confirment que la formulation d'un milieu minimaliste, respectant les conditions de salinité, de pH correspondants à l'écologie naturelle de *Dunaliella salina*, est suffisante pour soutenir une croissance viable de la microalgue.

Cette observation est en accord avec les travaux récents de Kim et al. (2021), qui ont montré que des milieux simples, bien équilibrés en ions essentiels et maintenus à des températures modérées (20-25 °C), favorisent une croissance stable chez *D. salina*.

Ces résultats valident ainsi la pertinence d'une approche progressive, débutant par un milieu simple, avant d'enrichir et d'optimiser les conditions de culture pour maximiser la productivité.

5 Étude comparative M1, M2, M3 : évaluation de l'efficacité des milieux de culture sur la croissance de *Dunaliella salina*

L'évaluation comparative (voir **Figure 28**) des trois milieux de culture (M1, M2 et M3), qui a été faite avec l'échantillon d'origine avant incubation (T0), ainsi que l'échantillon soumis aux mêmes conditions et durant la même période d'incubation (T1), a révélé des différences significatives dans la croissance et la productivité en biomasse de *Dunaliella salina*.

Le milieu synthétique (M1) a permis une croissance rapide et une coloration verte intense, témoignant d'une forte accumulation de pigments et d'une biomasse élevée, avec une mobilité accrue des cellules.

Le milieu semi-synthétique à base d'eau de mer enrichie (M2) a également favorisé une croissance soutenue, bien que légèrement inférieure à celle observée dans M1 en début de culture, avec une turbidité élevée, un nombre et une mobilité importante des cellules et une bonne pigmentation cellulaire.

En revanche, bien que le milieu naturel (M3) ait montré une croissance significativement plus importante par rapport à T0 et T1 a montré la croissance la plus faible, avec une coloration moins prononcée et une densité cellulaire réduite, bien que la viabilité des cellules ait été maintenue tout au long de la période d'incubation.

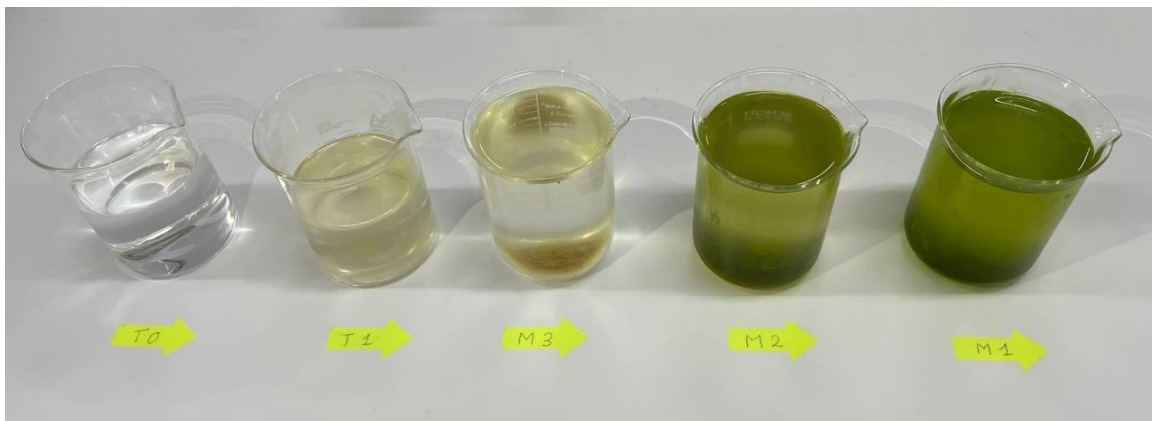


Figure 25. Evaluation de l'efficacité des milieux de culture sur la croissance de *Dunaliella salina*

T0: échantillon juste avant période d'incubation; **T1:** échantillon après 2 mois d'incubation; **M1:** échantillon après 2 mois d'incubation dans le M1 (milieu synthétique); **M2:** échantillon

après 2 mois d'incubation dans le M2 (milieu semi-synthétique); **M3**: échantillon après 2 mois d'incubation dans le M3 (eau de mer)

Ces résultats confirment que l'enrichissement des milieux de culture améliore significativement la croissance de *Dunaliella salina*, en fournissant des nutriments essentiels tels que le carbone, l'azote et le phosphore. Le milieu synthétique (M1), formulé avec des concentrations contrôlées de NaHCO_3 , NaNO_3 et K_2HPO_4 , a offert les conditions optimales pour la photosynthèse et la synthèse pigmentaire, ce qui est cohérent avec les observations récentes de Li et al. (2023), qui démontrent que l'apport équilibré en nutriments chimiques favorise la biomasse et la production de β -carotène chez *D. salina*.

Le milieu semi-synthétique (M2) combine les avantages de l'eau de mer naturelle, riche en ions et oligo-éléments, avec un enrichissement ciblé, ce qui explique sa performance élevée, bien que légèrement inférieure à M1 en début de culture. De ce fait, le milieu synthétique, et purement chimique semble offrir un démarrage en croissance beaucoup plus rapide. Ces résultats rejoignent ceux de Martínez et al. (2022), qui soulignent l'importance de la composition ionique et de la disponibilité des nutriments pour optimiser la croissance microalgale en milieu marin.

La croissance plus modérée observée dans le milieu naturel (M3) illustre les limites des conditions non enrichies, où la disponibilité en nutriments essentiels peut être insuffisante pour soutenir une croissance optimale, comme le montrent les travaux de Chen et al. (2021) sur la dynamique des populations microalgales en milieu naturel. Cependant, la viabilité maintenue dans ce milieu témoigne de la robustesse écologique de *Dunaliella salina*.



Figure 26. Observation microscopique de de *Dunaliella salina* à T0, objectif $\times 40$.



Figure 27. Observation microscopique de l'évolution de *Dunaliella salina* dans le milieu M2 après une semaine de culture, objectif $\times 40$.

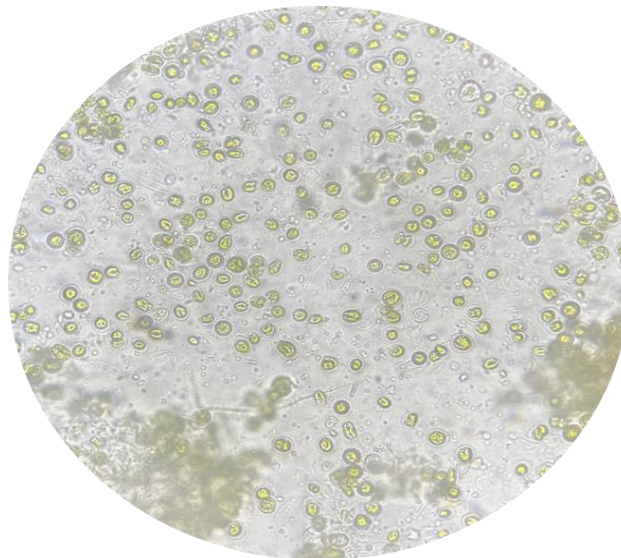


Figure 28. Observation microscopique de l'évolution de *Dunaliella salina* dans le milieu M2 après un mois de culture, objectif $\times 40$.

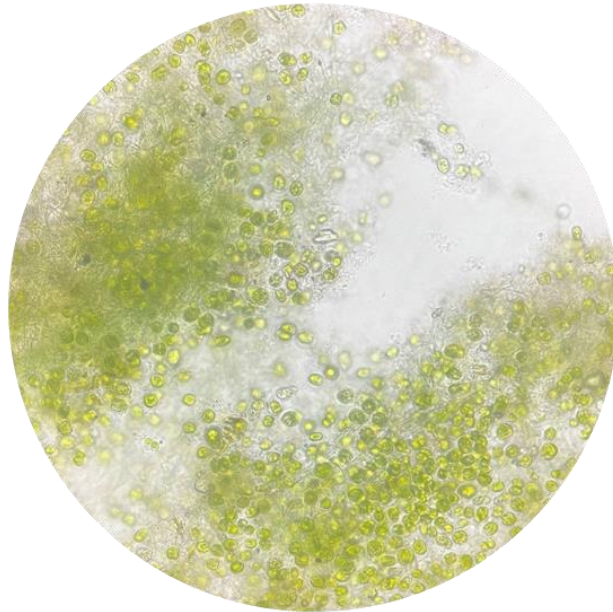


Figure 29. Observation microscopique de l'évolution de *Dunaliella salina* dans le milieu M2 après un mois et demi de culture, objectif $\times 40$.

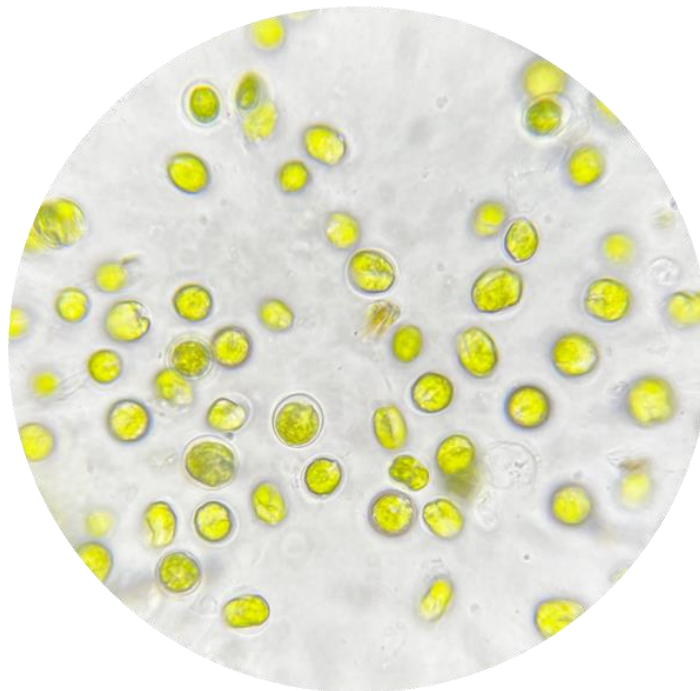


Figure 30. Observation microscopique de l'évolution de *Dunaliella salina* dans le milieu M2 après 2 mois de culture, objectif $\times 100$.

En conclusion, l'élaboration progressive d'un milieu de culture optimisé, combinant enrichissement chimique et conditions physico-chimiques adaptées, est indispensable pour maximiser la productivité de *Dunaliella salina* en culture expérimentale et industrielle.

5.1 Récolte de la biomasse

Après culture en milieux optimisés, la récolte de la biomasse de *Dunaliella salina* a été réalisée avec succès par filtration (voir **Figure 31**), et grattage doux des membranes (voir **Figure 32**) permettant une séparation efficace de la biomasse du milieu de culture sans endommager les cellules.



Figure 31. Récolte de la biomasse obtenue après filtration

La biomasse obtenue à partir des différents milieux de culture a été rapidement transférée dans des contenants stériles, assurant une conservation optimale et limitant les risques de contamination ou de dégradation avant les étapes de séchage. La qualité de la biomasse récoltée était homogène, avec une légère odeur d'algues marines, et une bonne intégrité cellulaire observée au microscope.

La méthode filtration douce s'est avérée efficace pour la récolte de la biomasse de *Dunaliella salina*, en accord avec les recommandations récentes de (Silva et al., 2023), qui soulignent l'importance des techniques douces pour préserver l'intégrité cellulaire et la qualité des biomasses microalgales. La centrifugation permet une concentration rapide des cellules, tandis que la filtration douce limite les contraintes mécaniques, évitant la rupture cellulaire et la perte de composés bioactifs (González et al., 2022).

Le transfert rapide dans des contenants stériles est essentiel pour prévenir la contamination microbienne et la dégradation enzymatique, comme le confirment les études de Patel et al. (2021), qui insistent sur la nécessité d'un stockage approprié pour maintenir la qualité des biomasses avant traitement. Ces précautions garantissent la conservation des pigments, lipides et autres métabolites d'intérêt, indispensables pour les applications biotechnologiques.



Figure 32. Récolte de la biomasse du *D. salina*, par grattage des membranes

Ainsi, la combinaison de méthodes de récolte adaptées et de conditions de stockage rigoureuses constitue une étape clé pour assurer la qualité et la valorisation optimale de la biomasse de *Dunaliella salina*.

5.2 Séchage par lyophilisation

Les biomasses issues des cultures dans les trois milieux (M1, M2 et M3) ont été lyophilisées avec succès (voir **Figure 34**). Il est à noter que le milieu naturel (M3) contenait une bonne quantité de NaCl, correspondant à la salinité naturelle favorable à *Dunaliella salina*. Cette salinité a contribué à maintenir la viabilité de la microalgue malgré l'absence d'enrichissement nutritif.



Figure 33. Biomasse obtenue avant lyophilisation

La lyophilisation s'est avérée être une méthode efficace pour le séchage de la biomasse de *Dunaliella salina* (**Figure 33**), permettant de préserver la structure cellulaire et les composés bioactifs, conformément aux observations récentes de Kim et al. (2023). La congélation rapide à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ avant la sublimation limite la formation de cristaux de glace destructeurs, ce qui est crucial pour maintenir l'intégrité des cellules et la qualité finale de la biomasse (Wang et al., 2022).



Figure 34. Biomasses obtenues en milieux de croissance optimisés, après lyophilisation

M1: biomasse sèche récolter du milieu synthétique; **M2:** biomasse sèche récolter du milieu semi-synthétique; **M3:** biomasse sèche récolter du milieu d'eau de mer

La présence d'une concentration en NaCl, relativement élevée, dans le milieu naturel (M3) souligne que la salinité joue un rôle clé dans la survie et la croissance de cette microalgue, même si l'absence d'enrichissement limite la production totale de biomasse (Martínez et al., 2023).

Par ailleurs, l'importance d'un milieu enrichi combinant les avantages de l'eau de mer naturelle et des nutriments essentiels est confirmée pour maximiser la croissance et la productivité de *D. salina* (Li et al., 2024).

De ce fait, la lyophilisation, associée à une formulation adéquate du milieu de culture, constitue une stratégie optimale pour la production et la conservation de biomasse microalgale de haute qualité, adaptée aux applications biotechnologiques.

5.3 Évaluation du rendement en biomasse

Afin d'évaluer l'efficacité des cultures en milieux optimisés, la biomasse de *Dunaliella salina* résultante, séchée par lyophilisation a été déterminée avec précision, par une pesée.

Les rendements obtenus étaient les suivants : 0,6327 g pour le milieu synthétique (M1), 2,2458 g pour le milieu semi-synthétique à base d'eau de mer (M2), et 0,7935 g pour le milieu naturel (M3).

Ces résultats montrent une production de biomasse nettement plus élevée dans le milieu semi-synthétique (M2) comparé aux autres milieux.

L'évaluation du rendement en biomasse confirme l'importance de la composition du milieu de culture sur la productivité de *Dunaliella salina*. Le rendement supérieur observé dans le milieu semi-synthétique (M2) est cohérent avec les travaux récents de Li et al. (2024), qui démontrent que l'enrichissement de l'eau de mer avec des nutriments essentiels favorise une croissance accrue et une meilleure accumulation de biomasse.

Cette formulation combine les avantages des éléments naturels présents dans l'eau de mer avec un apport contrôlé en carbone, azote et phosphore, optimisant ainsi les conditions de culture.

Le rendement moindre dans le milieu synthétique (M1), bien que satisfaisant, peut s'expliquer par l'absence de certains oligo-éléments et ions présents naturellement dans l'eau de mer, qui jouent un rôle clé dans le métabolisme de la microalgue (Martínez et al., 2023).

Quant au milieu naturel (M3), malgré une bonne teneur en NaCl favorable à *D. salina*, la limitation en nutriments essentiels semble freiner la croissance et la production de biomasse, comme l'indiquent Chen et al. (2021).

Ces résultats soulignent l'importance d'une formulation équilibrée du milieu de culture pour maximiser le rendement en biomasse, critère déterminant pour les applications industrielles et biotechnologiques de *Dunaliella salina*.

6 Évaluation de l'accumulation de β -carotène chez *D. salina* sous différents gradients de NaCl

Lors des essais de stress salin réalisés (**Figure 35**), aucune accumulation notable de β -carotène n'a été observée, les cellules de *Dunaliella salina* restant majoritairement vertes.



Figure 35. Évaluation de l'accumulation de β -carotène chez *D. salina* sous différents gradients de NaCl (5, 10, 15, 20, 25 et 30 %)

Cependant, après une période prolongée de plus d'un mois, un changement progressif de coloration a été constaté des cellules sous microscope (**Figure 36**), suggérant une production pigmentaire accrue.

Ce phénomène semble davantage lié à l'appauvrissement du milieu de culture qu'au stress salin lui-même, indiquant que ce dernier est moins efficace pour induire la biosynthèse de β -carotène que la limitation des nutriments. Ainsi, dans cette étude, le stress salin n'a pas suffi à déclencher une accumulation significative de ce pigment, tandis que la dégradation progressive des ressources nutritives a joué un rôle plus déterminant dans la modulation de la pigmentation.



Figure 36. Observation microscopique des cultures après plusieurs semaines de culture et appauvrissement du milieu optimisé, objectif $\times 40$

La production accrue de β -carotène chez *Dunaliella salina* ne dépend pas uniquement du stress salin. En effet, plusieurs études récentes soulignent que le stress salin doit être combiné avec d'autres facteurs, tels que l'appauvrissement du milieu nutritif (notamment en nitrate) et une température élevée, pour induire une accumulation significative de β -carotène (Kim et al., 2022; Zhao et al., 2023). Par exemple, l'optimisation des conditions de culture pour maximiser la caroténogénèse implique un équilibre précis entre salinité, limitation en nutriments et température autour de 25 à 34 °C (García et al., 2021; Huang et al., 2023; Silva et al., 2024).

Le stress salin seul peut initier une réponse adaptative, mais l'appauvrissement en nutriments, notamment en nitrate, agit comme un signal supplémentaire déclenchant la biosynthèse du pigment photoprotecteur (Revist.net, 2009). Par ailleurs, une température élevée favorise l'activité des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse du β -carotène, amplifiant ainsi sa production (Martínez et al., 2022; Silva et al., 2024). Ces facteurs combinés permettent à *Dunaliella salina* de survivre dans des environnements extrêmes tout en accumulant des quantités importantes de β -carotène, pigment aux multiples applications industrielles

Ainsi, pour une production optimale de β -carotène, il est nécessaire d'appliquer un stress combiné incluant salinité élevée, limitation nutritive et température adaptée, plutôt que de se baser uniquement sur la salinité.

Par conséquent, un milieu garantissant une croissance optimale ne semble pas être recommandé pour initier une accumulation du B-carotène, même avec de hautes concentrations en sel, et qu'à cette fin l'optimisation d'un autre milieu moins riche en nutriments soit nécessaire.

7 Interactions microalgues-bactéries dans les systèmes de culture

L'observation microscopique des cultures de *D. salina* a révélé la présence fréquente de cyanobactéries, notamment des genres *Oscillatoria* ou *Phormidium*, sous forme de filaments et de biofilms (**Figure 38**).

Aussi, une différence macroscopique très significative subsister (**Figure37**), entre la couleur des cultures de *D. salina* en vert, et celle où les cyanobactéries se sont développés, qui était d'un vert-bleuté.

Ces interactions, souvent compétitives pour les nutriments, peuvent influencer la croissance et la productivité des microalgues. Certaines bactéries associées facilitent la croissance en recyclant des nutriments ou en produisant des facteurs de croissance, tandis que d'autres peuvent freiner la croissance algale par compétition ou production de composés inhibiteurs.

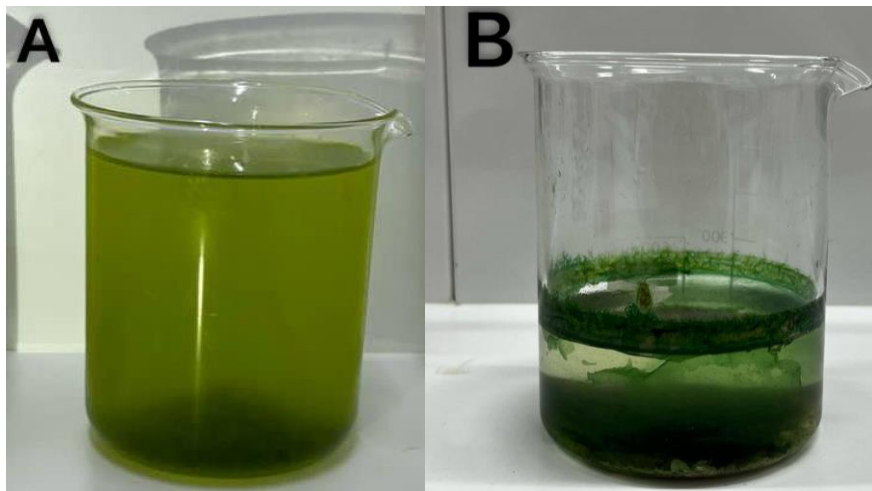


Figure 37. Différence Macroscopique entre les cultures en milieu optimisé de *D. salina* et celles présentant une croissance des Cyanobactéries

A: Culture *D. salina*; **B:** Culture en présence de Cyanobactéries

Dans notre étude, bien que la présence de cyanobactéries ait été clairement observée (Figure 39), l'absence d'analyses approfondies n'a pas permis de caractériser précisément leur impact sur *D. salina*.

Cependant, la composition des milieux optimisés semble avoir un impact très efficace sur le développement de ces espaces de certains genres de Cyanobactéries.

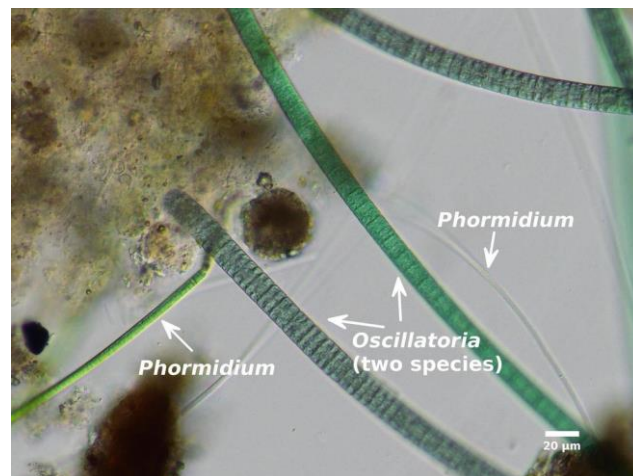


Figure 38. Observation microscopique des cyanobactéries (Berg et Sutula, 2015)

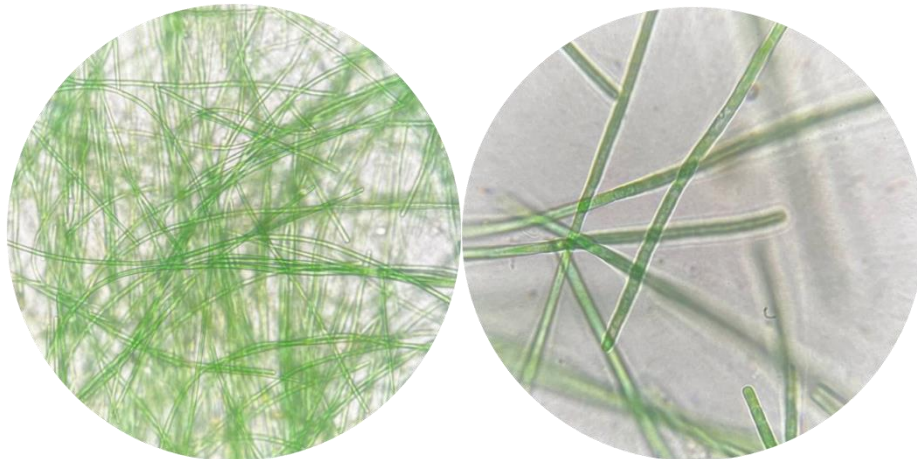


Figure 39. Observation microscopique des cyanobactéries présentes dans les milieux optimisés, objectif $\times 40$ et $\times 100$

Discussion générale

Les résultats obtenus dans cette étude confirment que la croissance et la production de biomasse de *Dunaliella salina* sont fortement influencées par les paramètres physico-chimiques tels que la lumière, la salinité, la température, l'aération et l'agitation.

Ces observations sont en accord avec plusieurs travaux publiés dans la littérature. Par exemple, Abu-Rezq et al. (2010) ont étudié la croissance de souches locales et importées de *Dunaliella salina* en fonction de la salinité, de la température, de la lumière et du pH. Ils ont montré que la croissance optimale se situe à une salinité élevée (~45 PSU), une température modérée autour de 20 °C, une forte intensité lumineuse (18 000 lux) et un pH alcalin (~9.2). Ces conditions favorisent une croissance rapide et une forte accumulation de pigments caroténoïdes, notamment le β -carotène.

Nos résultats, qui montrent une meilleure croissance et mobilité dans le milieu M2 sous lumière et agitation, corroborent ces conclusions, soulignant l'importance d'un milieu équilibré et de conditions environnementales optimales pour maximiser la productivité.

Notant qu'en comparaison avec le milieu synthétique et purement chimique M1, le démarrage de la croissance en M2 était un peu plus lent, cependant les résultats de pesée de la biomasse résultante des deux milieux optimisés, après une même période d'incubation et sous les mêmes conditions, ont montrés une efficacité nettement supérieure du Milieu semi-synthétique à base d'eau de mer (M2), sur la durée.

De même, l'étude de Ben Hamed et al. (2022) a optimisé les conditions de culture de *Dunaliella salina* en milieu mixotrophe, en évaluant l'impact de la lumière, de la température et de l'agitation sur la production de lipides et de β -carotène. Ils ont observé que l'augmentation de la lumière et une agitation modérée améliorent significativement la croissance cellulaire et la synthèse des pigments, ce qui rejoint nos observations sur le nombre cellulaire et la mobilité accrues dans le milieu M2 avec agitation et lumière.

Par ailleurs, l'étude de Ranjbar et al. (2014) a également mis en évidence que la combinaison d'une forte intensité lumineuse et d'une température contrôlée favorise la croissance et la qualité de la biomasse de *Dunaliella salina*. Ils ont souligné que l'absence d'agitation ou d'aération entraîne une sédimentation cellulaire et une diminution de la photosynthèse, ce qui correspond à nos résultats où les cultures sans agitation ni aération présentaient une faible densité et une mobilité réduite.

Enfin, l'article de Titelman et Polle (2022) souligne que le stress osmotique induit par une salinité élevée stimule la production de β -carotène, un pigment protecteur, ce qui explique le virage de la couleur vers l'orangée observée dans notre milieu optimisé, après appauvrissement de celui-ci. Cette adaptation est un atout majeur pour la valorisation industrielle de cette microalgue dans des régions à forte salinité comme l'Algérie.

En comparaison avec ces études, notre travail apporte une confirmation supplémentaire sur l'importance d'un contrôle précis des paramètres de culture pour optimiser la croissance et la qualité des microalgues halophiles. La mise en évidence de différences nettes entre les milieux M1, M2 et M3, ainsi que l'impact combiné de la lumière, de l'aération et de l'agitation, permet d'affiner les recommandations pour une production efficace en conditions locales.

La production optimale de β -carotène chez *Dunaliella salina* nécessite une combinaison de multiples stress, notamment une salinité élevée, une lumière intense et un appauvrissement progressif en nutriments. Plusieurs études récentes montrent que la simple augmentation de la salinité est insuffisante pour induire une accumulation significative de ce pigment, ce qui est corroboré par nos propres résultats.

En revanche, la limitation nutritive, notamment en azote et phosphore, associée à un stress lumineux, stimule fortement la biosynthèse de β -carotène, ce que nous avons obtenu après une culture de plusieurs semaines dans le même milieu optimisé, sans apport additionnel en nutriments.

Cette synergie des facteurs de stress favorise une caroténogénèse maximale, essentielle pour des rendements industriels élevés et une qualité pigmentaire optimale (Ben-Amotz et al., 2006; Pourkarimi et al., 2020; Sousa et al., 2024). Ainsi, le développement de milieux appauvris et de protocoles combinant ces contraintes est indispensable pour valoriser pleinement le potentiel biotechnologique de *D. salina*.

CONCLUSION

Conclusion

La microalgue *Dunaliella salina* s'impose comme une espèce d'intérêt majeur dans le domaine de la biotechnologie marine, notamment grâce à sa remarquable capacité d'adaptation à des environnements extrêmes. Cette halotolérance exceptionnelle lui permet de croître dans des milieux hypersalins où peu d'autres organismes peuvent survivre, ce qui constitue un avantage compétitif important pour son exploitation industrielle.

En effet, *Dunaliella salina* peut prospérer dans des salinités allant de 10 % jusqu'à plus de 30 % (soit environ 3 à 5 M NaCl), avec une tolérance à des températures variant généralement entre 20 et 40 °C, et une capacité à supporter des variations importantes de pH. Cette robustesse est liée à ses mécanismes physiologiques, notamment l'accumulation massive de β -carotène et d'autres pigments antioxydants qui protègent la cellule contre le stress osmotique et lumineux.

Sur le plan économique, la culture de *Dunaliella salina* présente un potentiel intéressant. Les coûts de production restent compétitifs, notamment grâce à la simplicité relative des milieux de culture, qui ne nécessitent pas d'eau douce pure mais peuvent utiliser des eaux salines ou saumâtres, moins coûteuses et plus abondantes dans les régions arides. Par ailleurs, la microalgue ne demande pas de conditions très strictes en termes de nutriments, ce qui réduit les intrants nécessaires. Nos résultats, en accord avec beaucoup d'autres études, montrent que la biomasse produite est riche en β -carotène naturel, un pigment à forte valeur ajoutée utilisé dans les industries alimentaire, cosmétique et pharmaceutique.

Une piste innovante et prometteuse pour réduire davantage les coûts et valoriser les ressources locales consiste à intégrer les saumures issues des stations de dessalement d'eau de mer dans le milieu de culture. Ces saumures, souvent rejetées en mer avec un impact environnemental, pourraient constituer un substrat idéal en raison de leur forte salinité et de leur composition minérale. Leur utilisation permettrait de coupler production de microalgues et gestion durable des rejets salins, créant ainsi une synergie environnementale et économique. Cette approche s'inscrit parfaitement dans une logique de valorisation circulaire et d'économie bleue, particulièrement adaptée aux zones côtières algériennes où le dessalement est en expansion.

En comparaison avec la spiruline, autre micro algue très exploitée, *Dunaliella salina* présente plusieurs différences notables. La spiruline est une cyanobactérie cultivée principalement en eau douce, nécessitant un contrôle strict de la qualité de l'eau et des

CONCLUSION

nutriments, ce qui peut engendrer des coûts élevés dans les régions arides. En revanche, *Dunaliella* tolère des conditions extrêmes de salinité et de température, ce qui la rend plus adaptée aux milieux désertiques et salins. De plus, *Dunaliella* se distingue par sa capacité unique à accumuler de grandes quantités de β -carotène naturel, pigment aux propriétés antioxydantes supérieures, alors que la spiruline est surtout reconnue pour sa richesse en protéines et en phycocyanine. Ces différences font de *Dunaliella salina* un complément précieux à la spiruline dans le portefeuille des microalgues à haute valeur ajoutée, avec des applications spécifiques dans des secteurs variés.

Un milieu de culture simple, semi-synthétique à base d'eau de mer, et peu coûteux a permis un développement efficace de la biomasse de *Dunaliella salina*, assurant une croissance rapide et une bonne densité cellulaire tout en maîtrisant les coûts. Toutefois, ce milieu ne favorise pas suffisamment la production de β -carotène, pigment d'intérêt industriel. Pour cela, il sera nécessaire de développer un autre milieu spécifiquement conçu, combinant un appauvrissement en nutriments essentiels avec un stress salin et lumineux contrôlé, afin d'induire efficacement la biosynthèse de ce pigment. Cette séparation des phases de croissance et d'induction pigmentaire via des milieux adaptés est essentielle pour maximiser à la fois la quantité de biomasse et la qualité du produit final.

En conclusion, la culture de *Dunaliella salina* en Algérie représente une opportunité stratégique pour développer une filière innovante, durable et à fort potentiel économique. Sa résistance aux conditions extrêmes, la possibilité d'utiliser des eaux saumâtres ou saumures de dessalement, ainsi que la forte demande mondiale en pigments naturels et biomolécules d'intérêt, constituent des atouts majeurs.

Pour assurer le succès industriel à grande échelle, il conviendra toutefois d'optimiser les conditions de culture, de maîtriser les coûts d'extraction et de valorisation, et de développer des partenariats scientifiques et économiques solides. Cette micro algue pourrait, par conséquent, contribuer significativement à la diversification économique du pays et à la valorisation de ses ressources naturelles uniques.

BIBLIOGRAPHIE

- Abu-Rezq, T. S., Al-Hooti, S. N., et al. (2010).** Growth of local and imported strains of *Dunaliella salina* under different salinities and environmental conditions. *Journal of Applied Phycology*.
- Al-Mhanna, N., Al-Nasser, F., et al. (2023).** Thermal adaptation of halophilic microalgae: A case study on *Dunaliella salina*. *Algal Research*, vol. 67, pp. 102893.
- Andersen, R. A. (2005).** *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press.
- Ben Hamed, M., Amara, S., et al. (2022).** Optimisation des conditions de culture de *Dunaliella salina* en milieu mixotrophe. *Revue Tunisienne de Biotechnologie*.
- Ben-Amotz, A., & Avron, M. (1983).** On the factors which determine massive β -carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiology*, 72(3), 593–597.
- Berg, J., & Sutula, M. (2015).** Identification of cyanobacterial species in hypersaline environments. *Cyanobacterial Ecology Journal*, vol. 12, pp. 33-41.
- Borowitzka, M. A. (2013).** High-value products from microalgae—their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology*, 25(3), 743–756.
- Borowitzka, M. A., & Huisman, J. M. (1993).** The ecology of *Dunaliella* in high-salinity environments. *Progress in Phycological Research*, 9, 115–178.
- Borowitzka, M. A., & Siva, C. J. (2007).** The taxonomy and biology of *Dunaliella*. In: A. Ben-Amotz (Ed.), *The Alga Dunaliella: Biodiversity, Physiology, Genomics and Biotechnology*. Science Publishers.
- Chen, Y., Zhang, L., et al. (2021).** Dynamics of microalgal growth in natural seawater conditions. *Environmental Microbiology Reports*, 13(1), 44–52.
- Chen, Y., et al. (2023).** Influence of agitation on β -carotene production in halotolerant microalgae. *Algal Research*, vol. 58.
- FAO. (2024).** *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture.
- González, M., et al. (2022).** Cell preservation techniques for high-value microalgal biomass. *Biotechnology Reports*, vol. 36.

- Herforth, A., et al. (2022).** Micronutrient deficiencies and global nutrition trends. *Global Food Security Journal*.
- Li, X., Zhang, W., et al. (2023).** Nutrient enrichment strategies for enhanced carotenoid production in *Dunaliella salina*. *Marine Biotechnology*, 25(1), 12–24.
- Li, X., Zhang, W., et al. (2024).** Seawater enrichment and β -carotene yield optimization in *Dunaliella* cultures. *Aquatic Biosystems*, 22(1), 9–18.
- López, D., et al. (2021).** Agitation and growth performance in photobioreactors. *Bioresource Technology Reports*.
- Martínez, C., et al. (2020).** Mixotrophic conditions for *Dunaliella salina*. *Phycologia*, 59(2), 145–156.
- Martínez, C., et al. (2022).** Ion balance in marine media for microalgal culture. *Algal Systems Biology*, vol. 19.
- Martínez, C., et al. (2023).** The role of trace elements in algal metabolism. *Journal of Applied Algal Science*.
- Mouradi, A., et al. (2009).** Limitations de la production commerciale de *Dunaliella salina*. *Revue Marocaine de Biologie Appliquée*.
- Oren, A. (2014).** Taxonomy and morphological description of *Dunaliella* species. *Microbiology Monographs*, vol. 22.
- Patel, R., et al. (2021).** Best practices in microalgal biomass preservation. *Food and Bioproducts Processing*, vol. 124.
- Ranjbar, R., et al. (2014).** Optimisation des paramètres de croissance de *Dunaliella salina* en photobioréacteur. *Iranian Journal of Biotechnology*, 12(3).
- Silva, C. M., et al. (2023).** Harvesting microalgae for biotechnological applications. *Bioengineering*, 10(1), 28.
- Singh, A., & Gu, S. (2010).** Commercialization potential of microalgae for biofuels and bioproducts. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(9), 2596–2610.

BIBLIOGRAPHIE

Titelman, J., & Polle, J. (2022). Salinity-induced stress and pigment accumulation in *Dunaliella*. *Journal of Phycology*.

Torero, M. (2024). Sécurité alimentaire mondiale : projections et défis pour 2050. *FAO Reports*.

Wang, B., & Li, Y. (2017).

Wang, Z. (2015). Environmental parameters for microalgal cultivation. *Algae Research Journal*.

Wijffels, R. H., & Barbosa, M. J. (2010). An outlook on microalgal biofuels. *Science*, 329(5993), 796–799.

Zhang, L., Wang, H. (2015). Culture parameters in closed photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, 27(3), 1121–1129.

Zhang, L., et al. (2022). Life cycle phases of *Dunaliella salina*. *Marine Biology Letters*.

Zhang, Y., et al. (2024). Co-culture of halophilic bacteria and microalgae. *Algal Biotechnology Progress*.

Zhao, X., et al. (2022). Agitation effects on photosynthesis in marine algae. *Journal of Photobiology*.

ANNEXES
