

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Mouloud MAMMERY de Tizi-Ouzou  
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques



*Département de Biologie Animale et Végétale*

## *MEMOIRE DE FIN D'ETUDES*

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie

**Spécialité :** Biologie végétale.

**Option :** Génétique et Amélioration des plantes.

## *THEME*

**Contribution à l'étude de la production de biomasse chez une microalgue verte *Chlorella sp* souche isolée dans le parc national du Djurdjura (forêt de Darna)**

Réalisé par : M<sup>elle</sup> KHALDI Hafidha

M<sup>elle</sup> ZEGGAOUI Zohra

Soutenu le : 19/11/2014 devant le jury composé de :

M <sup>me</sup> TALEB-TOUDERT K.	Maître assistante Classe A	UMMTO	Présidente
M <sup>me</sup> YAKOUB-BOUGDAL S.	Professeur	UMMTO	Promotrice
M <sup>r</sup> GHOBRINI D.	Doctorant	UMMTO	Co promoteur
M <sup>r</sup> BOUAZIZ-YAHIA TENE H.	Maître assistante Classe A	UMMTO	Examineur
M <sup>me</sup> LAKABI-AHMANACHE L.	Maître assistante Classe A	UMMTO	Examineur
M <sup>r</sup> AIBOUD K.	Doctorant	UMMTO	Invité

Année 2013/2014

## *Remerciements*

*Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Cytologie et Morphogenèse Végétale (CMV) du Pr. BOUGDAL-YAKOUB S. (UMMTO).*

*Nous tenons avant tout à exprimer notre profonde reconnaissance à M<sup>me</sup> BOUGDAL-YAKOUB S., Professeur à la faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques de l'UMMTO Responsable de notre spécialité « Génétique et Amélioration des plantes, et responsable de notre formation, pour nous avoir accepté au Laboratoire de CMV et mis à notre disposition le matériel nécessaire à la réalisation de ce travail, nous avons beaucoup appris au cours de ces années sous sa direction grâce à ses connaissances et à sa patience. Nous lui exprimons notre gratitude pour son aide à tout instant et pour avoir accepté avec beaucoup d'amabilité d'être notre promotrice.*

*Nous prions M<sup>r</sup> GHOBRIINI D. notre co-promoteur et maître de stage, qui nous a beaucoup aidé afin que ce mémoire acquière toute sa dimension scientifique.*

*Nous prions M<sup>r</sup> AÏBOUD K, de trouver ici l'expression de toute notre gratitude pour avoir fait volontairement preuve de soutien et de patience lors de la réalisation de notre travail.*

*Nous adressons nos sincères remerciements à M<sup>me</sup> TALEB K, Maître assistant A à la faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques de l'UMMTO qui a bien voulu examiner notre mémoire.*

*Nous remercions également M<sup>me</sup> BOUAZIZ H. Maître assistant A à la faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques de l'UMMTO pour accepter d'examiner ce travail.*

*Nous remercions également M<sup>me</sup> LAKABI L. Maître assistant B à la faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques de l'UMMTO pour accepter aussi d'examiner ce travail.*

*Nos remerciements vont aussi à M<sup>r</sup> FERRAGUE N. Assistant de M<sup>me</sup> YAKOUB-BOUGDAL S., pour son aide et sa grande disponibilité.*

*Nos remerciements sincères vont également :*

*Aux ingénieurs du laboratoire M<sup>elle</sup> Abrous et M<sup>elle</sup> Bousmak, M<sup>elle</sup> Khadir et M<sup>elle</sup> Houari pour leur soutien et encouragements.*



## *DEDICACE*

*Je dédie ce mémoire*

*A tous ceux grâce à qui je suis la femme que je suis*

*A ma très chère mère Tassadit et à mon très cher père*

*A mes frères et sœurs adorés car ce travail est aussi le leur.*

*Razika qui a tant souffert pour moi, qu'elle retrouve en  
ce travail l'expression de ma profonde piété filiale.*

*A Dalila, idir, amar et houcine, pour leur soutien sans cesse  
ininterrompu.*

*A mes enseignants, mes collègues et à tous mes amis*

*Retrouvez ici l'expression de ma profonde reconnaissance.*





## DEDICACE

*Je dédie ce modeste travail à*

- ♣ *La mémoire de ma chère grand mère KOULA  
et que dieu la garde dans son vaste paradis ;*
- ♣ *Mes parents*
- ♣ *Ma chère mère et mon frère MOULOUD  
pour leurs encouragements depuis toujours ;*
- ♣ *Mes sœurs qui m'on soutenue toujours, ainsi le  
mari de ma sœur MALIK ;*
- ♣ *Mon cousin Boussaad Amani ;*
- ♣ *Mon cousin MASSINISSA ;*
- ♣ *Toute ma famille*
- ♣ *Mes proches amies HAMIDA, FARIDA,  
LEILA et FETTA ;*
- ♣ *Tous ceux qui me connaissent.*

*Zohra*



## Sommaire

<b>Introduction</b> .....	01
<i>Chapitre I : Synthèse bibliographique</i>	
<i>Les microalgues : Caractéristiques et propriétés</i>	
1- Les microalgues .....	03
1.1- Caractéristiques générales .....	03
1.2- Classification et phylogénie.....	03
1.2.1- Les procaryotes .....	04
1.2.1.1- Les Cyanophycées (cyanobactéries) .....	04
1.2.2- Les eucaryotes .....	05
1.2.2.1- Les diatomées (bacillariophycées) .....	06
1.2.2.2- Les Chlorophycées (algues vertes) .....	06
1.2.2.3- Les Chrysophycées (algues dorées) .....	07
1.2.2.4- Les Rhodophycées (Algues rouges).....	07
1.2.2.5- Les Euglenophycées.....	07
1.3- Caractéristiques morphologiques et physiologiques.....	07
1.4- Distribution et habitat.....	10
1.5- Composition biochimique .....	10
1.6- Sélection de la microalgue .....	12
1.6.1- Position taxonomique du genre <i>Chlorella</i> .....	12
1.6.2- La composition chimique de la Chlorelle pure .....	14
1.7- Importance des microalgues .....	15
2- La culture des microalgues.....	16
2.1- Paramètres du développement des microalgues.....	16
2.1.1- Lumière .....	16
2.1.2- Température.....	17
2.1.3- pH.....	17
2.1.4- Nutriments.....	18
2.1.4.1- Carbone .....	18
2.1.4.2- Azote.....	18
2.1.4.3- Phosphore.....	19
2.1.4.4- Micro-éléments.....	19
2.1.4.5- Salinité du milieu.....	20
2.2- Production de la biomasse.....	20
2.2.1- Culture en photoautotrophie.....	20
2.2.1.1- Systèmes ouverts (Raceways).....	20

[Tapez un texte]

2.2.1.2- Systèmes fermés (PBR) .....	22
2.2.2- Culture en hétérotrophie .....	24
2.2.3- La récolte des microalgues .....	25
2.2.4- Le séchage de la pâte algale .....	28
2.3- Application des microalgues.....	29
2.3.1- Domaine alimentaire .....	31
2.3.2- Domaine pharmaceutique .....	33
2.3.3- Domaine cosmétique.....	34
2.3.4- Domaine environnemental.....	34
2.3.5- Domaine énergétique .....	36
<b><i>Chapitre II : Matériel et méthodes</i></b>	
3- Expérimentation .....	38
3.1- Echantillonnage et zone de prélèvement .....	38
3.1.1- Généralités sur le site d'étude .....	39
a- Présentation du relief .....	39
b- Hydrologie .....	39
c- Climat .....	39
3.2- Méthode de prélèvement .....	41
3.3- Matériel .....	41
3.3.1- Matériel végétal .....	41
3.3.2- Matériel de culture <i>in vitro</i> .....	41
3.4- Protocole suivi .....	41
3.5- Isolement et culture .....	42
3.2.2- Identification .....	44
3.2.3- Culture des chlorelles .....	44
3.2.4- Mesure des taux de croissance.....	46
<b><i>Chapitre III : Résultats et discussion</i></b>	
4. Résultats et interprétation .....	48
4.1- Prolifération et isolation des microalgues .....	48
4.2- Essais de production de biomasse par la souche isolée .....	52
<b>Conclusion</b> .....	54
<b>Références bibliographiques</b> .....	56
<b>Autre références (Webographie)</b> .....	61

## Liste des tableaux

Tableau I :	Les groupes d'algues les plus importants en terme d'abondance (SHARMA et RAI, 2011).....	04
Tableau II :	Rendement en biomasse de différentes cultures végétales (CHISTI, 2007).....	15
Tableau III:	Les différents domaines de valorisation des microalgues (A.R.V.A.M.) .....	30
Tableau IV:	Les principales espèces de microalgues commercialisées.....	31
Tableau V	Températures maximales, minimales et moyennes mensuelles de l'année 2013 pour la région d'étude .....	40
Tableau VI:	Milieu de culture BG 11 ( $g\ l^{-1}$ ) .....	44
TableauVI :	Milieu de culture Bold's Basal (BB) .....	46

## Liste des figures

Figure 1	Exemples de quelques espèces d'algues bleues (FILALI, 2012) .....	05
Figure 2	Exemple de microalgues eucaryotes (IFREMER, 2012).....	06
Figure 3	Diversité morphologiques des microalgues (SUMI, 2009 <i>in</i> FILLALI, 2012) .....	08
Figure 4	Schéma d'un chloroplaste (ANONYME, 2014) .....	08
Figure 5	Phases photochimique et chimique de la photosynthèse (ANONYME, 2014) .....	09
Figure 6	Structure morphologique de la chlorelle (BEER et al., 2009) .....	13
Figure 7	Schéma d'une microalgue (FERMENTALG et CEA, 2012) .....	15
Figure 8	Principe de fonctionnement des systèmes de culture ouverts (raceways) (BECERRA- CELIS, 2009) .....	21
Figure 9	Culture en raceways (ANONYME , 2011).....	22
Figure 10	Photobioréacteur (PBR) de laboratoire pilote à éclairage externe (GEPEA, 2012)...	23
Figure 11	Fermenteur de production d'Oméga-3 à partir de microalgues (FERMENATLG, 2013).....	25
Figure 12	Principe de la filtration (ANEX, 2012) .....	26
Figure 13	Centrifugeuse modèle <i>Hettich</i> (ANONYME, 2006) .....	26
Figure 14	La floculation (ANONYME, 2014) .....	27
Figure 15	Floculant naturelle le <i>Chitosan</i> (ANONYME, 2014) .....	27
Figure 16	Electrofloculation de microalgues (CABATUANDO et al., 2011) .....	28
Figure 17	Séchage par atomisation .A : (CHEFTEL et BESSANCON, 1977) et B : (ANONYME 2010).....	29
Figure 18	Formes nutritives des microalgues (ANONYME, 2011) .....	33
Figure 19	Procédé de traitement des eaux par les microalgues (FILALI, 2012) .....	35
Figure 20	Représentation schématique du procédé de fixation de $CO_2$ par les microalgues à partir du gaz d'échappement industriel (FILALI, 2012) .....	36
Figure 21	Procédés de production de biocarburant via les microalgues (FILALI, 2012) .....	37
Figure 22	Localisation géographique de la région d'étude (AMROUN et al., 2011).....	38
Figure 23	Zone de prélèvement du cours d'eau d'Assif El Hammam (Originale, 2014).....	40
Figure 24	Hotte à flux laminaire horizontale. (ANONYME, 2014) .....	43

Figure 25	Dispositif de production de biomasse en culture discontinue sur le milieu BB .....	45
Figure 26	Prolifération des microalgues dans le milieu de culture solide (BG 11) à partir de différents prélèvements.....	49
Figure 27	Aspect des microalgues pendant la phase d'isolement ; observées au microscope photonique, avec apparitions des contaminations, grossissement (Gx40 « A » et Gx10 « B ») .....	49
Figure 28	Souche de microalgue appartenant à la famille des Chlorelles (a : observation de la culture d'isolement ; b : observation de <i>Chlorella sp</i> sous microscope optique G x 100).....	50
Figure 29	Technique de repiquage en stries et le résultat obtenu.....	51
Figure 31	Cinétique de croissance de <i>Chlorella sp.</i> en milieu Bold's Basal (BB).....	52

## LISTE DES ABREVIATIONS

A.R.V.A.M	: Agence pour la Recherche et la Valorisation Marine .
CIT	: Carbone Inorganique Total.
DO	: Densité optique.
MCC	: Mécanisme de Concentration en CO <sub>2</sub> .
nm	: Nanomètre.
rpm	: Rotation par minute.
TAGs	: Triacylgcérides.
VIH	: Virus d'Immunodéficience Humaine.



# Introduction

Pour un souci permanent de réduction des émissions de gaz à effet de serre et de préservation de l'environnement, nous devons nous intéresser aux bioénergies, ces dernières semblent incontournables.

De plus, les pressions économiques liées à l'instabilité politique des régions d'extraction pétrolière ou à l'augmentation des coûts du pétrole jouent également un rôle dans le développement des biocarburants qui apparaît comme l'une des réponses à ces difficultés.

Dans son discours sur l'état de l'Union en janvier 2006, le président George W. Bush déclarait : *"Pour que l'Amérique soit compétitive, il faut de l'énergie à un coût acceptable. Et c'est là que nous avons un sérieux problème : l'Amérique est dépendante du pétrole, qui provient souvent de régions du monde instables. Le meilleur moyen de se débarrasser de cette addiction est la technologie"* (ANONYME<sub>1</sub>, 2006). Ce constat est fait par les États-Unis, est valable pour tous les pays dépendants de l'énergie pétrolière, d'où un intérêt croissant pour la bioénergie c'est-à-dire l'énergie renouvelable obtenue par transformation chimique de la biomasse.

Fabriqués à partir de matières organiques végétales, les biocarburants sont classés en deux catégories principales : l'éthanol, issu de la fermentation de sucres, qui peut remplacer l'essence et le biodiesel, produit à partir d'huiles, qui sont un substitut au diesel.

La matière première utilisée pour la fabrication d'un biocarburant définit sa génération. La première génération issue de ressources agricoles conventionnelles rencontre des problèmes dus à une compétition avec l'agroalimentaire. Une deuxième génération repose sur la biomasse lignocellulosique. Enfin, une troisième génération de biocarburant provenant de microalgues est en cours de développement.

Les microalgues sont utilisées pour la production de composés à haute valeur ajoutée tels les biocarburants qui se développent depuis plusieurs années. Elles présentent des caractéristiques biochimiques très intéressantes qui leur confèrent un grand nombre d'applications à l'échelle scientifique et industrielle dans différents domaines à savoir : la production de molécules à hautes valeurs ajoutées exploitées dans le domaine pharmaceutique et cosmétique, l'alimentation humaine et animale et la production d'énergie renouvelable à travers la synthèse biologique d'hydrogène, de méthane et de carburant.

Toutefois, le coût de production de la biomasse algale constitue un facteur limitant pour le développement des différentes filières.

Parmi les algues cultivées actuellement dans divers pays, les espèces du genre *Chlorella* sont exploitées dans l'alimentation, la médecine, la cosmétologie, aquaculture, etc...) et sont largement étudiées en tant que biocarburant en raison de leur haute efficacité photosynthétique et de leur capacité à produire des lipides. Par ailleurs, leur très grande diversité spécifique, la plasticité de leur métabolisme permet d'orienter ces organismes vers la production du ou des métabolites souhaités, en fonction des conditions de culture adoptées (TAHRI et al., 2000).

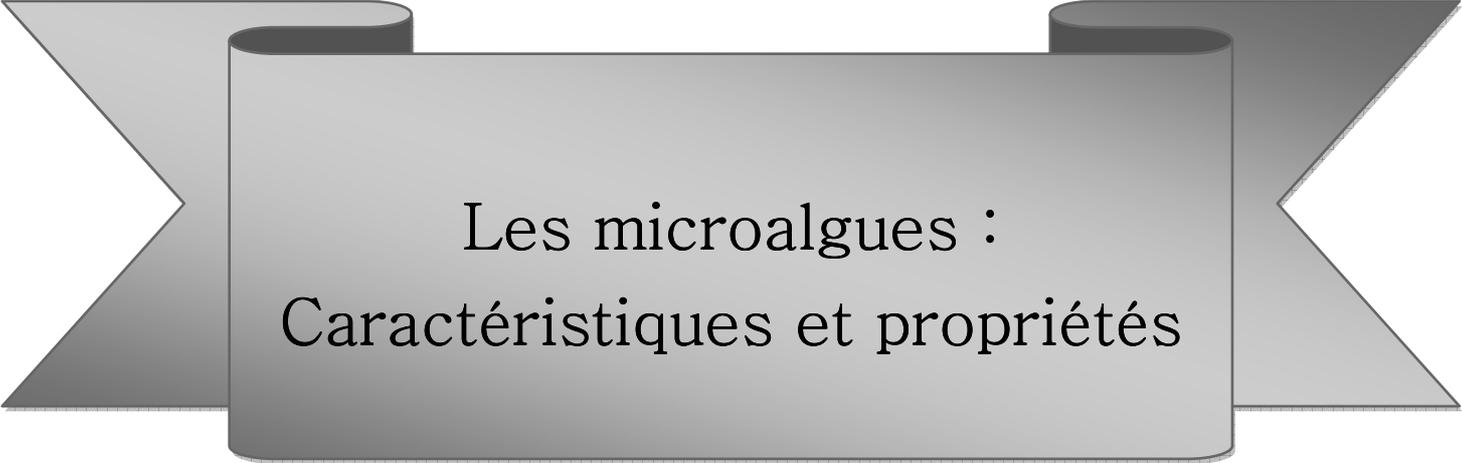
*Chlorella sp.* est une algue unicellulaire eucaryote de la famille des Chlorellaceae (HOEL et *al.*, 1995) qui croît à la fois dans des conditions phototrophiques et mixotrophiques principalement en eau douce, c'est un organisme très étudié dans les laboratoires du monde entier pour différentes raisons telles que son taux de croissance élevé sous une variété de conditions (tolérance à de fortes intensités lumineuses, aux températures élevées et aux concentrations élevées en  $CO_2$  et du fait de son exploitation dans le domaine de l'énergie renouvelable. (MATSUKAWA et *al.*, 2000; SOROKIN, 1959).

En condition d'autotrophie, la croissance des algues dépend étroitement de l'activité photosynthétique (MAZLIAK, 1998, HELLER, 2002). Il est donc clair que l'utilisation efficace de la lumière est une condition préalable à la réussite des processus de production industrielle. Il a été démontré que les facteurs physiques de l'environnement à savoir, la température, le *pH* et le type de milieu de culture peuvent jouer des rôles dans le raccourcissement des cycles et l'induction morphogénétique (GHOBINI et *al.*, 2014).

L'objectif de notre travail est l'étude de la croissance d'une culture de microalgues sous l'influence de nombreux paramètres physico-chimiques qui sont: la lumière (la photopériode), et la nature du milieu de culture chez une chlorophycée *Chlorella sp.* souche isolée dans le parc national du Djurdjura (forêt de Darna).

Le travail exposé dans la présente étude comprend deux parties lesquelles sont organisées comme suit :

- ✚ Une synthèse bibliographique qui va mettre en avant l'importance des microalgues dans les différentes filières citées ci-dessus ainsi que l'étude des différents facteurs influents la culture des microalgues afin d'optimiser la biomasse algale et la rendre économiquement viable.
- ✚ La deuxième partie concerne la zone d'étude, les matériels et méthodes utilisés.
- ✚ La troisième partie porte sur les résultats obtenus, la discussion, et une conclusion générale.



Les microalgues :  
Caractéristiques et propriétés

## **1- Les microalgues**

### **1.1- Caractéristiques générales**

Les microalgues font partie des premiers organismes vivants apparus sur notre planète (il y a plus de trois milliards d'années). Elles représentent le premier maillon de la chaîne alimentaire des océans et assurent le fonctionnement des grands cycles biologiques. De même qu'elles contribuent au maintien de la biodiversité et synthétisent les molécules organiques indispensables à la vie (GHOBINI et *al.*, 2014). Elles sont à l'origine de la moitié de la photosynthèse réalisée à la surface du globe et se trouve à la base de toutes les chaînes alimentaires en milieu océanique, à l'instar des plantes dans le milieu terrestre (NABORS, 2008), et leur transfert de l'énergie solaire en une biomasse s'avère efficace.

Les microalgues représentent une source d'alimentation pour les premières étapes larvaires comme pour les êtres humains de par leur composition biochimique adaptée (FILALI, 2012).

Toutefois, les organismes du phytoplancton sont extrêmement sensibles aux variations de température ainsi qu'à la pollution. Une modification de quelques degrés de la température de l'eau ou une augmentation de la pollution ont un effet majeur sur la survie du phytoplancton, ce qui, en fin de compte, affecte tous les organismes, y compris les êtres humains, situés en aval dans les chaînes alimentaires (NABORS, 2008).

Les microalgues sont largement et principalement connues étant des organismes photoautotrophes. L'autotrophie est un mode de nutrition des microalgues leur permettant d'utiliser les rayons solaires afin de synthétiser leur énergie. Les microalgues de métabolisme autotrophe utilisent également une source de carbone inorganique comme le  $CO_2$  et le  $HCO_3^-$  pour la synthèse du carbone organique. Ce dernier est essentiel à la synthèse de toutes les composantes organiques nécessaires à leur survie.

D'autre part, plusieurs microalgues ont un métabolisme hétérotrophe de nutrition et celles-ci n'ont pas besoin de l'énergie solaire. Elles utilisent plutôt une source de carbone organique pour la production de l'énergie et des composants organiques (CANTIN, 2010).

En outre, plusieurs espèces de microalgues sont capables de passer d'une croissance photoautotrophe (grâce à de la lumière qui fournit l'énergie pour convertir le  $CO_2$  en chaînes carbonées) à une croissance hétérotrophe (sans lumière) utilisant le glucose ou d'autres substrats carbonés utilisables pour le métabolisme du carbone et de l'énergie (PERSON, 2010).

### **1.2- Classification et phylogénie**

Les microalgues, présentent une diversité plus grande que celle de toutes les plantes terrestres (GHOBINI et *al.*, 2014). Il existe sur le globe au moins 200 000 espèces différentes. Certains auteurs avancent même des chiffres supérieurs à un million d'espèces (CADORET et BERNARD, 2011).

De nos jours, leur biodiversité est à peine explorée, ainsi, et environ 47 000 espèces de microalgues ont été répertoriées. A cet égard, les possibilités de valorisation de cette richesse naturelle apparaissent donc très importantes. Pourtant, seule une cinquantaine d'espèces sont étudiées de manière détaillée au niveau de laboratoire de recherches et une dizaine d'espèces uniquement sont exploitées au niveau industriel et commercial.

Selon SHARMA et RAI (2011), les espèces les plus importants en termes d'abondance se rencontrent toutes dans les quatre classes données dans le Tableau I.

**Tableau I :** Les groupes d'algues les plus importants en terme d'abondance (SHARMA et RAI, 2011)

<b>Algues</b>	<b>Nombre d'espèces</b>	<b>Formes de Réserves</b>	<b>Habitat</b>
Diatomées ( <i>Bacillariophyceae</i> )	100, 000	<i>Chrysolaminarine</i> (Polysaccharides) et TAGs*	Océans, eaux douces et Saumâtres
Algues vertes ( <i>Chlorophyceae</i> )	8,000	Amidon et TAGs	Eaux douces
Algues bleu-vert ( <i>Cyanophyceae</i> )	2,000	Amidon et TAGs	Différents habitats
Algues brunes ( <i>Phéophyceae</i> )	1,000	TAGs et hydrates de carbone	Eaux douces

\* TAGs : Triglycérides (triacylglycérides)

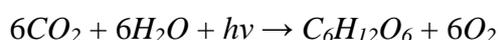
Ces organismes constituent un groupe polyphylétique et très diversifié de procaryotes (les algues bleues ou cyanobactéries) et eucaryotes (où l'on retrouve les algues vertes, rouges et brunes). Le classement en divisions est basé sur diverses propriétés telles que la pigmentation, la nature chimique des produits de stockage issus de la photosynthèse, l'organisation des membranes photosynthétiques et d'autres caractéristiques morphologiques (PERSON, 2010). Ainsi on y distingue principalement deux grands groupes de microalgues.

### 1.2.1- Les procaryotes

Ce sont des organismes unicellulaires qui sont dépourvus d'une membrane nucléaire et ne présentent que très rarement des organites cellulaires.

#### 1.2.1.1- Les Cyanophycées (Cyanobactéries)

Les cyanobactéries ou cyanophycées, encore appelées algues bleues, auraient permis la production d'oxygène dans l'atmosphère en réalisant la photosynthèse, suivant la réaction universelle de la photosynthèse :

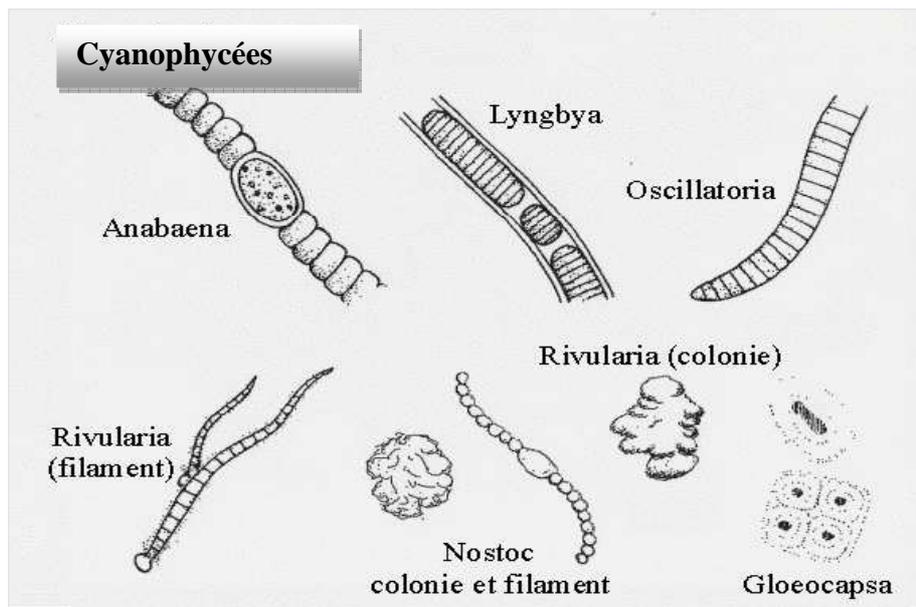


Selon PERSON (2010), sur la base de leur structure procaryote typique, elles sont considérées dans les classifications actuelles comme étant des bactéries photosynthétiques oxygéniques (fig. 1).

Bien qu'étant des procaryotes, les cyanobactéries ont un système photosynthétique proche des végétaux chlorophylliens. Elles possèdent de la chlorophylle a et un photosystème II. Comme les algues rouges, elles ont des phycobiliprotéines comme pigments accessoires.

Elles peuvent être retrouvées dans pratiquement tous les habitats (eaux fraîches, eaux salées, eaux saumâtres et sols) étant donné leur aptitude à résister à des températures extrêmes et leur résistance à la dessiccation. Les cyanophycées emmagasinent principalement leur énergie sous forme d'amidon (amylose et amylopectine) ou encore sous forme d'huiles (CANTIN, 2010). Les espèces les plus connues sont *Spirulina (Arthrospira) plantensis*, *Nostoc commune* et *Aphanizomenon flos-aquae*.

Une seconde classe de cyanobactéries, les "*Prochlorophyta*", présente une spécificité au niveau de la pigmentation avec une absence totale de phycobiliprotéines, mais une présence de chlorophylle a et b (FILALI, 2012).



**Figure 1** : Exemples de quelques espèces d'algues bleues. (FILALI, 2012).

### 1.2.2- Les eucaryotes

Les cellules eucaryotes possèdent un vrai noyau délimité par une enveloppe nucléaire. Au sein du cytoplasme délimité par la membrane plasmique, les organites subdivisent le cytosol et constituent autant de compartiments différents (ARICO et al., 2013) (fig. 2).



**Figure 2** : Exemple des microalgues eucaryotes (modifiée la détermination de quelques espèces de microalgues par KHALDI et ZEGAOUI in Algues, PDF d'ANDRE ILTIS).

a- *Volvox aureus*.

b- *Glosterium parvulum*.

c- *Cosmarium binum*.

d- *Pediatrum boryanum*.

e- *Micrasterias foliacea*.

f- *Cresigenia fenestria*.

g- *Lepocinclis ovum*.

h- *Anabaenopsis circularias*.

### 1.2.2.1- Les diatomées (bacillariophycées)

Les diatomées représentent souvent le groupe dominant de microalgues parmi les populations de phytoplancton et sont extrêmement répandues dans tous les types d'habitat (CANTIN, 2010) avec plus de 100 000 espèces connues (FILALI, 2012). Elles sont unicellulaires et sont souvent réunies en chaîne. Leur paroi cellulaire (ou frustule) est composée de substances pectiques associées à la silice (DABBADIE, 1992).

Les diatomées emmagasinent leurs réserves sous forme de chrysolaminarane, un polysaccharide, ainsi que des huiles. Elles sont d'ailleurs reconnues et exploitées pour leur contenu en acides gras (CANTIN, 2010).

### 1.2.2.2- Les Chlorophycées (algues vertes)

Elles sont très abondantes en eaux douces. Elles peuvent se développer en mode unicellulaire ou en colonies qui peuvent devenir très denses. Elles accumulent l'énergie qu'elles capturent, principalement par photosynthèse, sous la forme d'hydrates de carbone et d'huiles (DESCHENES, 2009). On dénombre actuellement 8 000 espèces, dont 1 000 sont des chlorophytes marines.

Les espèces les plus connues sont *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Dunaliella* ainsi que *Haematococcus* (FILALI, 2012), L'espèce la plus étudiée est *Chlorella vulgaris*. Cette espèce est très intéressante pour la production de biodiesel en raison de son pourcentage intéressant en acides gras. Les principales sources de carbone assimilables le sont sous forme de sucres et d'acide acétique.

D'autres espèces faisant partie de cette classe ont un potentiel intéressant pour la production d'algocarburants dont notamment l'espèce *Chlorella protothecoides* (CANTIN, 2010).

### **1.2.2.3- Les Chrysophycées (algues dorées)**

Les *chrysophycées* se retrouvent surtout en eaux douces et on en compte environ 1 000 espèces. Elles ressemblent aux diatomées mais elles peuvent arborer plus de couleurs que ces dernières : du jaune au brun en passant par l'orange. Chez plusieurs espèces d'algues dorées l'enveloppe est principalement composée de silice et en plus faible proportion de cellulose (DESCHENES, 2009).

### **1.2.2.4- Les Rhodophycées**

Ce sont des algues de pigmentation rouge qui sont capables de se développer dans les eaux saumâtres et salées. Cette classe comprend près de 400 espèces présentant dans la majorité des cas un métabolisme photoautotrophe (FILALI, 2012).

### **1.2.2.5- Les Euglenophycées**

Il existe plus de 800 espèces d'euglenophycées qui sont retrouvées généralement dans les eaux saumâtres et douces. Les principales réserves de ces algues sont constituées de paramylon, une substance glucidique, et d'huiles (CANTIN, 2010).

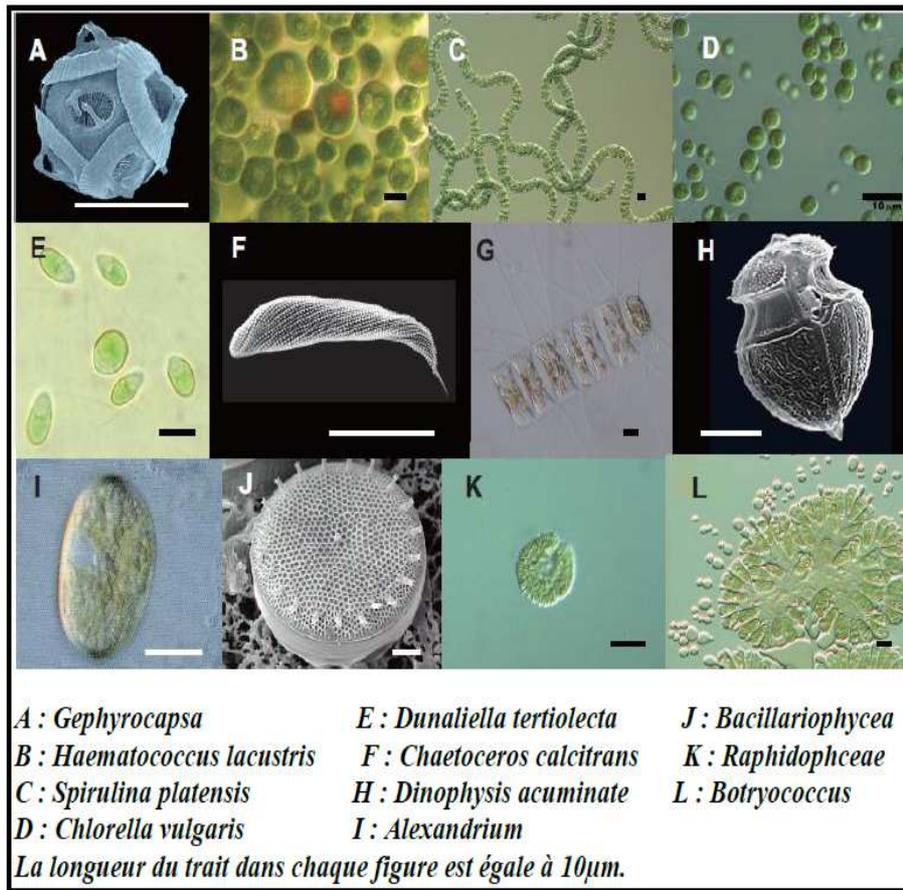
## **1.3- Caractéristiques morphologiques et physiologiques**

D'une grande simplicité d'organisation (absence de structures spécialisées), les microalgues ont une taille de l'ordre du micromètre et se présentent sous des formes variables : souvent sphériques (*Porphyridium*), en forme de croissant (*Clostridium*), de spirale (*Arthrospira*), de gouttelette (*Chlamydomonas*) et même d'étoile (*Staurastrum*) (fig. 3) (SUMI, 2009 in FILALI, 2012).

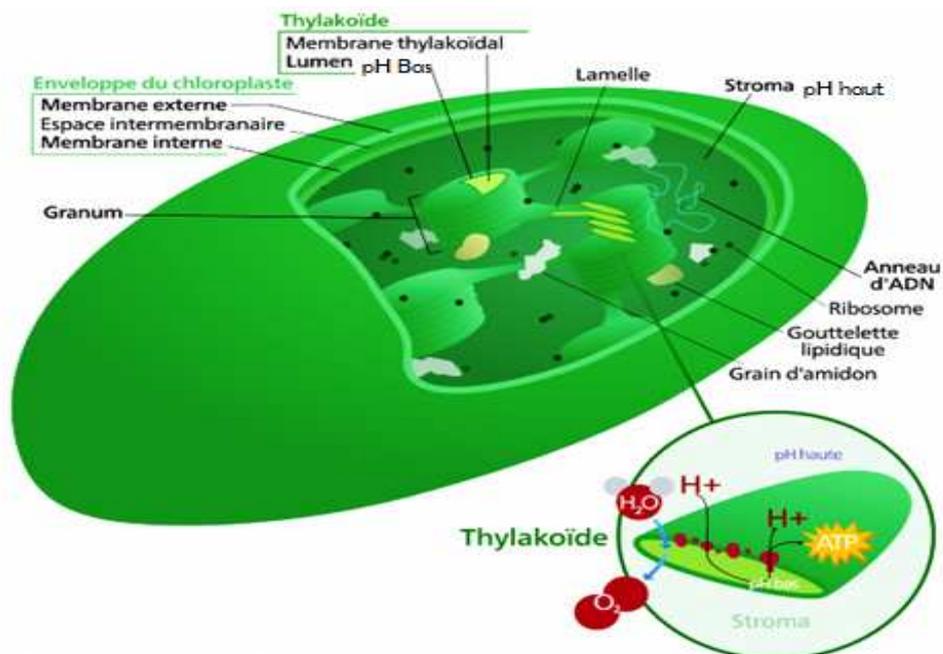
Du point de vue structure cellulaire, la microalgue présente un noyau et une membrane plasmique contenant des organites essentiels à son fonctionnement tels que les chloroplastes, les amyloplastes, les oléoplastes et les mitochondries. Elle contient trois principaux types de pigments qui sont les chlorophylles, les caroténoïdes et les phycobiliprotéines.

Comme tous les organismes possédant des chloroplastes, les microalgues sont capables de transformer l'énergie lumineuse en énergie chimique pour leur développement, par le biais du métabolisme photosynthétique :

La photosynthèse se déroule en deux étapes : une étape photochimique et une non-photochimique. Ce processus a lieu dans les chloroplastes qui sont des organites présents dans le cytoplasme des cellules eucaryotes photosynthétiques (fig. 4).



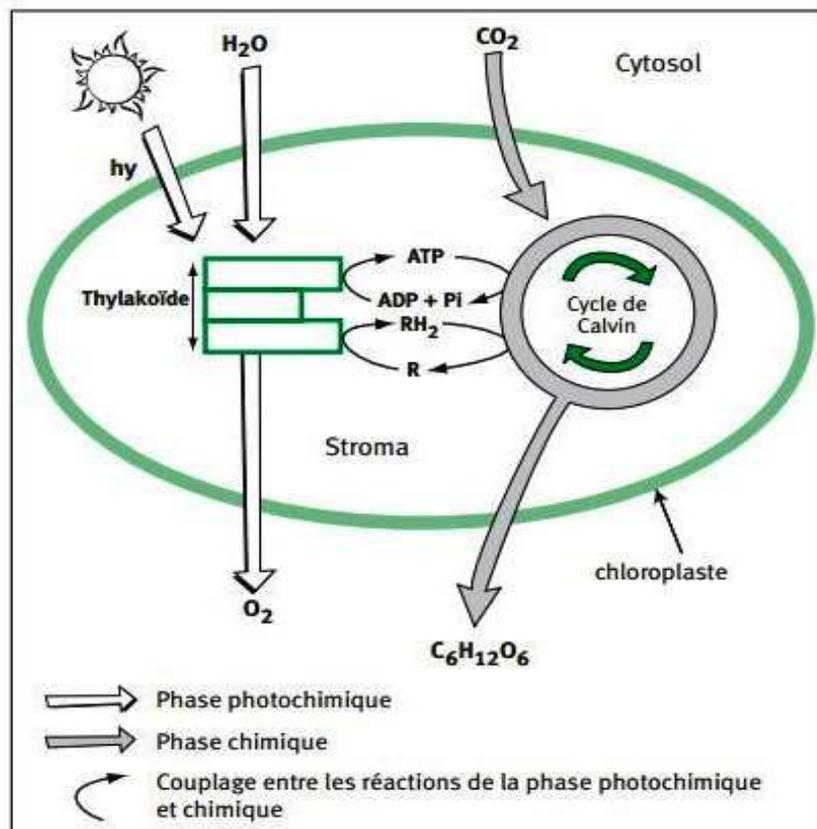
**Figure 3 :** Diversité morphologique des microalgues (SUMI, 2009 in FILLALI, 2012)



**Figure 4 :** Schéma d'un chloroplaste (ANONYME 2014).

L'étape photochimique (phase claire) se déroule dans les thylakoïdes des chloroplastes et nécessite de la lumière. La chlorophylle présente dans les chloroplastes joue un rôle important dans le métabolisme photosynthétique, en effet c'est elle qui permet d'absorber les radiations rouges, violettes et certaines radiations bleues ; de plus elle permet de convertir l'énergie lumineuse absorbée sous une forme permettant les réactions de synthèse de se produire, comprenant des réactions photochimiques entraînant le transfert d'électrons extraits de l'eau vers le  $\text{NADP}^+$  et la création d'un potentiel électrochimique localisé de part et d'autre de la membrane des thylacoïdes permettant la synthèse d'ATP. Le transfert d'électrons de l'eau au  $\text{NADP}^+$  requiert de l'énergie, celle-ci provient des photosystèmes.

L'étape non photochimique (phase sombre) est séparée spatialement et temporellement de la phase claire. Elle comprend un ensemble de réactions enzymatiques formant le cycle de Calvin au cours duquel le carbone est fixé et réduit pour donner des triose-phosphates. Les enzymes du cycle sont localisées dans le stroma et le cycle utilise les produits de la phase claire, ce qui conduit à la formation des glucides (fig. 5).



**Figure 5** : Phases photochimique et chimique de la photosynthèse (ANONYME 2014).

Certaines microalgues peuvent accumuler, comme d'autres végétaux terrestres, le carbone sous forme de lipides. Les lipides ainsi stockés constituent une réserve de carbone pour l'organisme. En conditions normales, cela représente 20 à 50 % de microalgues, de plus les lipides sont principalement constitués de phospholipides et de glycolipides. Mais certaines, particulièrement prolifiques sont capables d'accumuler jusqu'à 80% de leurs poids sec en lipides. Ce stockage de lipides est dû à un déséquilibre transitoire entre le flux de carbone issu de la photosynthèse et le flux d'autres éléments, phosphore ou azote, nécessaires à la croissance. La cellule alors carencée en l'un de ces éléments, ne stoppe pas tout de suite l'acquisition de dioxyde de carbone nécessaire à la photosynthèse. Elle stocke donc ce flux sous forme de lipides.

Ainsi chez certaines microalgues, on observe des organites particuliers : les oléoplastes qui sont des organites spécifiques des cellules végétales présentant un stockage lipidique sous la forme de plastoglobules.

#### **1.4- Distribution et habitat**

Les microalgues sont capables de se développer dans un large éventail de conditions abiotiques. A cet égard, l'évolution des espèces a été accompagnée d'une diversification écologique, la majorité des espèces se développe dans des environnements aquatiques (océans, rivières, lacs, ... etc.), humides et ensoleillés (SUBHADRA et EDWARDS, 2010). Cependant, les microalgues présentent une capacité d'adaptation et de survie telles qu'elles se sont adaptées à différentes niches écologiques : des glaces polaires aux zones désertiques, arides et semi arides et aux sources d'eau chaudes. De même les milieux hyper salins, alcalins et/ ou acides sont colonisés par quelques espèces (SIALVE et STEYER, 2008). En outre, certaines espèces peuvent subsister dans les grottes, associées sous forme de symbioses avec tout type d'organisme vivant et même parasite, entre autre de l'homme. Elles sont également capables de se développer sur des surfaces rigides, tels que les murs ou les troncs d'arbres et même le sol (BECERRA–CELIS, 2009). Aussi, certaines espèces ont la particularité de croître même dans des conditions où la luminosité est très faible (SUBHADRA et EDWARDS, 2010).

Cette capacité ubiquitaire des microalgues est le résultat d'une part de leurs propriétés morphologiques (absence de formation complexe et présence de structure pariétale particulière) de l'autre à un métabolisme orienté capable entre autre de synthétiser différentes variétés de métabolismes notamment secondaires (FILALI, 2012 ; GHOBINI et *al.*, 2014).

#### **1.5- Composition biochimique**

L'intérêt des microalgues se manifeste par la diversité de leur composition biochimique, mais également par des particularités qui justifient l'utilisation de certains procédés de production. Ainsi l'absence de paroi autour des cellules de *Dunaliella* et l'existence de globules

de  $\beta$ -carotène extraplastidiaux permettent l'extraction de ce métabolite par des procédés utilisant des chocs osmotiques, ou des réacteurs biphasiques usant la diffusion du pigment à l'aide de solvants (do-décane), sans perte de viabilité (JENCK et al., 2011).

Les microalgues représentent une source importante de quasi toutes les vitamines essentielles : *B1*, *B6*, *B12*, *C*, *E*, *K1*, et possèdent un large panel de pigments, fluorescents ou non, pouvant aussi avoir un rôle d'antioxydants. En plus de la chlorophylle (0,5 à 1 % de la matière sèche) qui est le pigment photosynthétique primaire chez toutes les algues photosynthétiques, on trouve toute une gamme de pigments supplémentaires de type caroténoïdes (0,1 à 0,2 % de la matière sèche) et phycobiliprotéines (phycoérythrine et phycocyanine). Les pigments principalement exploités sont la phycocyanine, de la spiruline (colorant bleu), la phycoérythrine (couleur rouge) du *Porphyridium purpureum*, l'astaxanthine d'*Haematococcus pluvialis* ou le bêta-carotène de *Dunaliella salina*.

Elles peuvent accumuler plus de 50 % de leur poids sec en lipides. Ces derniers sont principalement constitués de triglycérides, de phospholipides, et de glycolipides (PERSON, 2010). La microalgue *Odontella aurita* est par exemple une source importante d'acides gras insaturés. Par ailleurs, l'huile extraite de *Schizochytrium* a été récemment autorisée en tant que nouvel ingrédient alimentaire.

A l'heure actuelle, la richesse en lipides des micro-algues et leur relative facilité de production font de ces dernières une source intéressante pour les secteurs de la pétrochimie afin de produire des biocarburants.

Certaines microalgues ont des constituants pariétaux particuliers tels que des polysaccharides sulfatés, pouvant donner des oligosaccharides, du  $\beta$ -glucane ou des glycoprotéines impliqués dans des processus d'agrégation cellulaire, utilisables comme biofloculants (JENCK et al., 2011). D'autres encore peuvent produire des molécules à activité antivirales, antibiotiques, ou anti-prolifératrices chez l'homme (PERSON, 2010).

Le contenu élevé en protéines, peptides et acides aminés (entre 12 et 65 % de matière sèche) de plusieurs espèces de microalgues est l'une des principales raisons pour les considérer comme une source non conventionnelle de protéines dans l'alimentation humaine et animale (pisciculture) (PERSON, 2010).

La cyanobactérie *Arthrospira platensis*, est mondialement reconnue pour ses qualités nutritionnelles supérieures à la viande et est préconisée dans la lutte contre la malnutrition sévère dans les pays en voie de développement. Cette cyanobactérie n'est toutefois pas la seule source de protéines d'origine algale. Certaines études ont mis en évidence la teneur élevée en protéines d'autres algues, protéines constituées d'ailleurs par des acides aminés essentiels. Ainsi, *Palmaria palmata* contient de la leucine, de la valine, de la méthionine et de l'acide

aspartique tandis qu'*Ulva pertusa* présente une fraction protéique riche en histidine et en thréonine, à des taux comparables à l'ovalbumine.

### 1.6- Sélection de la microalgue

Différents paramètres sont pris en compte dans la sélection d'espèces d'algues. Ces paramètres peuvent concerner la morphologie de l'espèce, la cinétique de croissance ainsi que l'impact des facteurs environnementaux tels que la lumière, le pH, etc.

D'après LEE et PARK (1995), la sélection de l'espèce algale repose sur les paramètres suivants :

- Tolérance importante vis-à-vis des concentrations de  $CO_2$  élevée ;
- Vitesse de croissance importante en présence de la forte concentration cellulaire ;
- Tolérance vis-à-vis des gaz toxiques tels que le monoxyde d'azote et le monoxyde de soufre ;
- Thermo-tolérance (tolérance vis-à-vis des températures élevées).

Au cours de notre travail nous nous sommes intéressées aux espèces du genre *Chlorella*, car ces dernières présentent un intérêt certain puisqu'elle réunit les 4 conditions précitées.

#### 1.6.1- Position taxonomique du genre *Chlorella*

*Chlorella sp* est une algue verte découverte en 1890 par le biologiste hollandais BEYERINCK, (ANONYME<sub>2</sub>, 2002) et depuis 1919, la position taxonomique de ce genre a été un sujet à controverse. En effet, en raison de la faible différenciation morphologique de leurs cellules plus ou moins sphériques, leurs taxonomie a été plutôt confuse (KESSLER et SOEDER, 1962). Ainsi, les caractéristiques morphologiques traditionnellement employées (taille et forme des cellules et des chloroplastes, la visibilité du pyrénocèle, etc) pour les définir se sont avérés être très variables et ambiguës (SHIHIRA et KRAUSS, 1965). Selon NEMCAVA et KALINA (2000) bien qu'il y ait une interprétation constante des diverses disciplines qui composent la botanique, c'est principalement par des critères physiologiques et biochimiques que les espèces du genre *Chlorella* continuent à être définies.

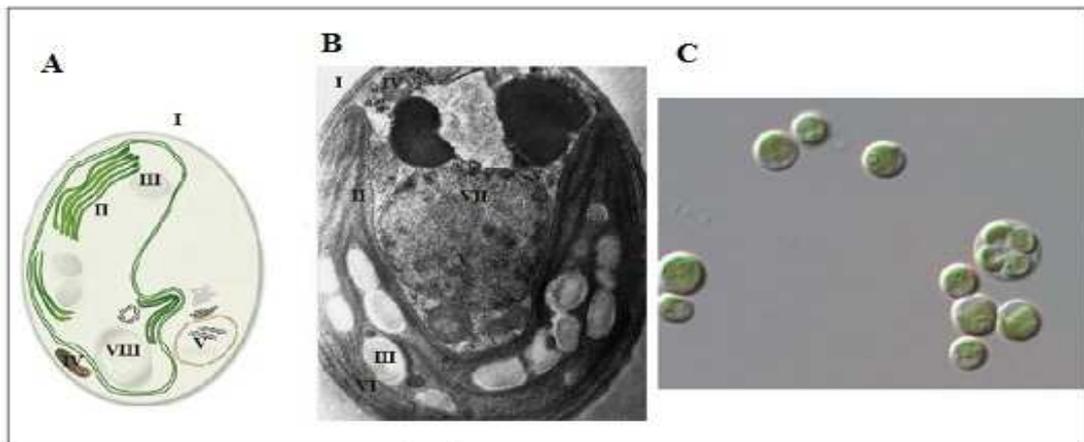
Récemment, les études moléculaires ont eu pour conséquence des données dépendantes sur l'histoire évolutive du genre *Chlorella*, ce qui a donné des résultats à des classifications mieux élaborées avec des groupes nécessairement plus petits. Un recensement récent dénombre environ 4 espèces du genre *Chlorella sensu stricto* (KRINITZ et al., 2004). Lesquelles sont :

- *C. vulgaris*
- *C. lobophora*
- *C. sorokiniana*
- *C. kessleri*

Aussi, les qualités de la chlorelle font qu'on voit souvent des appellations telles que :

- la chlorelle, l'algue détoxifiante.
- la chlorelle, l'aspirateur à toxines.
- la chlorelle, l'algue anti-métaux.
- la chlorelle, l'algue miraculeuse.

Les espèces du genre *Chlorella* sont unicellulaires eucaryotes de la famille des Chlorellaceae et de l'ordre des Chlorococcales (HOEL et al., 1995) qui croissent à la fois dans des conditions phototrophiques et mixotrophiques principalement en eau douce. Suivant la nature du milieu, les cellules peuvent être de formes et de tailles variables, respectivement, sphériques et/ ou ellipsoïdales et mesurent entre 3 et 10  $\mu$ . Elles possèdent un noyau, une paroi épaisse riche en dérivés de chitine, des mitochondries et un chromatophore de forme concave, vert, tournant parfois vers le blanc, cas des cellules âgées ou des cellules en culture dans un milieu organique riche en glucose, et doté d'un pyrénioïde massif (fig. 6) (NEMCAVA et KALINA, 2000, SHIHIRA et KRAUSS, 1969).



**Figure 6** : A : Structure morphologique de *Chlorella* (BEER et al., 2009) – B : Micrographie électronique d'une cellule de *C. vulgaris* en section longitudinale (RICHMOND, 2004) – C : Observation microscopique en DIC « Differential Interference Constat » de cellule de *C. vulgaris* (I: membrane plasmique ; II: chloroplaste; III: graine d'amidon ; IV: mitochondrie ; V: noyau ; VI : thylakoïde ; VII: membrane nucléaire ; VIII : pyrénioïde).

D'un point de vue expérimental, ces espèces sont très étudiées dans les laboratoires du monde entier pour différentes raisons telles que leurs taux de croissance élevés sous une variété de conditions (tolérance à de fortes intensités lumineuses, aux températures élevées et aux concentrations élevées en  $CO_2$ ) (SOROKIN, 1959 ; MATSUKAWA et al., 2000). De même que CHADER (2009), on travaillant sur une souche de cette espèce prélevée au sud Algérien à démontré sa haute tolérance à des concentrations élevées en oxygène lors de production d'hydrogène en anoxie.

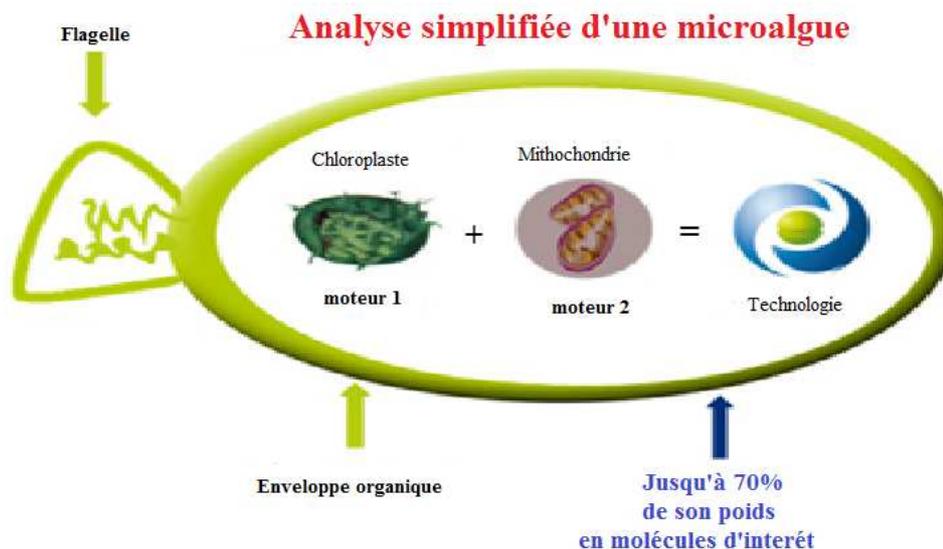
Ce sont des organismes haploïdes se reproduisant exclusivement par voie asexuée pouvant produire de 4 à 8 autospores par simple division mitotique (KNOBLOCH et TISCHNER, 1989), capables de se développer en milieu inorganique en utilisant la photosynthèse pour produire de l'ATP et des équivalents réducteurs (conditions phototrophes), ou en milieu organique (conditions hétérotrophes), dans ce cas la lumière n'est pas indispensable à son développement.

### **1.6.2- Composition chimique de la Chlorelle pure**

La chlorelle est une algue extrêmement riche, elle contient les éléments suivants (fig. 7) :

- Des protéines et des fibres: les protéines constituent plus de 50% de la composition de la chlorelle (environ 58% de son poids, c'est-à-dire 40 fois plus que le blé).
- Les pigments parmi lesquels la chlorophylle (4 fois plus que la spiruline qui est déjà très riche en chlorophylle) et la lutéine sont en concentration exceptionnelle. Ainsi, la chlorelle peut être considérée comme un super légume.
- Les lipides de la chlorelle sont notamment des acides gras essentiels polyinsaturés de type oméga 3 (comme dans la graine de lin ou la mâche).
- Les vitamines aussi sont présentes dans la chlorelle la plupart sont importantes:
  - La vitamine A: la chlorelle contient 10 fois plus de vitamine A que le foie de bœuf !
  - La vitamine B : (B1, B6, B12 qui se trouvent d'habitude dans la viande et les produits laitiers et B12 : 80 à 180 mg/100 g.
  - La vitamine C.
  - Et la vitamine E : 8 à 11 mg/100 g.
- Des acides aminés, environ 18.
- De très nombreux minéraux tels que le fer, calcium, magnésium, zinc, potassium, soufre, manganèse...
- Une très faible teneur en Iode, ce qui permet de la consommer en cas de problèmes thyroïdiens. (Anonyme 2., 2004)

Elle est donc un complément alimentaire très exceptionnel !



**Figure 7 :** Schéma d'une microalgue (FERMENTALG et CEA, 2012)

### 1.7- Importance des microalgues

Les microalgues présentent l'avantage d'avoir un cycle de division très court, de l'ordre de quelques heures, permettant la production rapide de biomasse (plusieurs grammes de matière sèche par litre) ce qui leur confère un rendement supérieur à celui des plantes supérieures (10 fois plus que les plantes terrestres) (tab. II). De plus, leur avantage majeur réside dans le fait qu'il n'entre pas en concurrence avec les productions répondant aux besoins de l'alimentation humaine ou des industries de transformation, des récoltes continuent sur l'année (permaculture) et pas d'apport de produits phytosanitaires (SUBHADRA et EDWARDS, 2010). Toutefois, les taux de croissance des microalgues sont fortement dépendants des espèces et des conditions de culture considérées en relation avec leur efficacité photosynthétique (ANDERSEN, 1992).

**Tableau II :** Rendement en biomasse de différentes cultures végétales (CHISTI, 2007)

Culture	Rendement (L/ ha/ an)
Soja	73
Camelina	94
Tournesol	155
Jatropha	307
Palmier à huile	970
Microalgues	1500 – 10000

En outre Les microalgues représentent une source de biomasse qui intéresse les nombreux secteurs des énergies renouvelables (ex. biocarburants, traitements des eaux usées).

Néanmoins, la quantité produite de chacune de ces sources dépend du rendement photosynthétique de l'espèce cultivée et des conditions de culture. Trois sources sont couramment exploitées : la biomasse, l'huile et le dihydrogène.

## **2- Culture des microalgues**

### **2.1- Paramètres du développement des microalgues**

La culture des microalgues est soumise à l'influence de plusieurs paramètres environnementaux physiques ou biologiques qui sont dépendants des caractéristiques intrinsèques de l'espèce algale et de la géométrie du système de production. Ces paramètres affectent non seulement l'activité photosynthétique et la productivité en biomasse, mais également le comportement physiologique et métabolique des microalgues dans la culture (RICHMOND, 2004).

Ce sont des facteurs abiotiques tels que la lumière, la source de carbone, les nutriments minéraux, la température, la salinité, le pH, la teneur en  $O_2$ ; et des facteurs biotiques tels que des pathogènes (bactéries, champignons, virus), des compétiteurs pour les ressources (algues exogènes) ou des prédateurs (hydres, copépodes). Pour ces derniers le problème est en grande partie résolu pour les algues croissant en milieu extrêmophile, comme les eaux hyper-salées (telle que *Dunaliella salina*) ou hyper alcalines (telle que la spiruline) qui limitent la croissance des prédateurs et des microorganismes concurrents (KUMAR et al., 2010).

Ainsi, avec la lumière, la température est le facteur limitant le plus important pour la culture des microalgues. En effet, beaucoup de microalgues peuvent facilement supporter des températures allant jusqu'à 15 °C en dessous de leur température optimale, mais la hausse de la température de seulement 2 à 4 °C au-dessus de leur température optimale peut entraîner la perte totale de la culture (ANEX, 2012).

Le même auteur ajoute, la salinité de l'eau peut affecter la croissance et la composition cellulaire des microalgues. Chaque microalgue a une gamme de salinité optimale différente qui peut augmenter dans des conditions météorologiques chaudes en raison de la forte évaporation. Les changements de salinité affectent les microalgues à cause du stress osmotique, du stress ionique et des changements de ratios ioniques cellulaires en raison de la perméabilité membranaire sélective aux ions. Néanmoins, la façon la plus simple de contrôler la salinité est l'addition d'eau douce ou salée selon les besoins (ANEX, 2012).

#### **2.1.1- Lumière**

La lumière est un des facteurs indispensables au métabolisme photosynthétique des microalgues. L'apport de l'énergie lumineuse peut se produire de manière naturelle grâce à

l'énergie solaire ou artificiellement grâce à des tubes fluorescents émettant la lumière à une longueur d'onde bien spécifique.

La croissance algale dépend de la disponibilité et de l'efficacité de l'utilisation de l'énergie lumineuse (SMITH, 2000). On notera l'importance du trajet lumineux, de la concentration cellulaire (qui trop importante pour induit le phénomène d'auto-ombrage), des caractéristiques pigmentaires des cellules algales (MALONE, 1982). Un apport insuffisant de lumière est susceptible de limiter la productivité et la croissance même si les autres paramètres sont à des valeurs optimales (RICHMOND, 1999).

Toutefois, les organismes chlorophylliens ont non seulement développé des mécanismes de conversion énergétique réalisée, par la photosynthèse des chloroplastes pour croître et se développer, mais également des systèmes multiples d'informations sur leurs conditions d'éclairement (BALLARE *et al.*, 1987; MAZLIAK, 1998).

### **2.1.2- Température**

La cinétique de croissance algale est influencée par la température (RICHMOND, 1999), en général cette dernière augmente la vitesse de croissance. Ce paramètre permet de réguler les réponses cellulaires, physiologiques et morphologiques des microalgues (KUMAR *et al.*, 2010). La température peut provoquer des changements de la structure cellulaire, et notamment de son volume (RICHMOND, 2004). Ainsi, une température supérieure à la valeur optimale induit une augmentation du volume cellulaire (HARRIS, 1988).

Les microalgues tolèrent en général une gamme de température comprise entre 15 et 26°C avec une concentration cellulaire optimale à 23°C (KUMAR *et al.*, 2010). Des températures extrêmes, supérieures à 35°C, peuvent constituer un optimum pour certaines espèces, alors qu'elles peuvent être létales pour d'autres espèces. De plus, l'augmentation de la température affecte le métabolisme de fixation de  $CO_2$  par les microalgues.

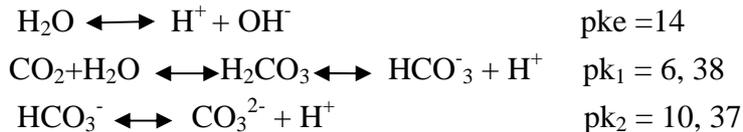
### **2.1.3- pH**

Ce paramètre dépend principalement de la concentration de  $CO_2$  dissous dans le milieu de culture est régi par les équilibres chimiques entre les différentes formes de carbone dans l'eau ( $CO_2$ ,  $H_2CO^3$ ,  $HCO^{3-}$  et  $CO_3^{2-}$ ). Un grand apport de  $CO_2$  peut entraîner une acidification du milieu, susceptible d'inhiber la croissance de plusieurs espèces de microalgues. De même, la présence de monoxyde de soufre, un élément toxique, entraîne une acidification importante du milieu et par là même une croissance limitée (KUMAR *et al.*, 2010). En conséquence, un contrôle du pH des cultures est nécessaire afin de favoriser la croissance de certaines espèces ayant des exigences environnementales particulières. De manière générale, la croissance algale est favorisée pour un pH proche de la neutralité.

## 2.1.4- Nutriments

### 2.1.4.1- Carbone

La source de carbone d'une culture algale en condition d'autotrophie est présente en phase liquide sous forme de différentes espèces en équilibre :  $CO_2$ ,  $H_2CO_3$ ,  $HCO_3^-$  et  $CO_3^{2-}$ . Ces équilibres sont régis par les équations de dissociation de l'eau et du mélange carbonate bicarbonate à une température de 25 °C (LIVANSKY, 1990 in FILLALI, 2012) :



Ces différentes formes de carbone constituent le carbone inorganique total « *CIT* ».

Durant la photosynthèse, la consommation du  $CO_2$  entraîne une augmentation progressive du pH, alors qu'en présence de concentrations importantes de  $CO_2$  dissous, le pH chute entraînant une consommation moindre de  $CO_2$  par suite de l'inactivation de l'enzyme « *Rubisco* » responsable de l'activité de fixation de  $CO_2$ . (SOBCZUK et al., 2010).

Une préférence de l'espèce algale peut être distinguée vis-à-vis de l'une des formes de carbone ( $CO_2$  ou  $HCO_3^-$ ) selon le mécanisme biologique de concentration du  $CO_2$  ou « *MCC* ». Généralement, les microalgues présentent une préférence vis-à-vis de l'assimilation du  $CO_2$  comme source de carbone inorganique (CARVALHO et al., 2006 in FILLALI, 2012).

### 2.1.4.2- Azote

L'azote constitue un élément nutritif essentiel pour la croissance algale. La teneur en azote des microalgues se situe aux alentours de 7 % de la matière sèche algale (BHOLA et al., 2011). La source d'azote pour la culture peut être organique (urée) ou inorganique (nitrate  $NO_3^-$ , ammoniacque  $NH_4^-$ ) (ALCAINE, 2010). L'azote, étant un des constituants des acides nucléiques et des protéines, est impliqué dans les principales voies métaboliques des microalgues (GREEN et DURNFORD, 1996). Ainsi, une augmentation de la concentration d'azote, jusqu'à une certaine valeur limitée, entraîne une productivité cellulaire et protéique plus importante et une synthèse plus significative de chlorophylle.

La carence de cet élément induit une accumulation importante de réserves lipidiques (polysaccharides et acides gras polyinsaturés "AGPI") (CHEN et al., 2011), une limitation de l'activité photosynthétique et cellulaire (ALCAINE, 2010) ainsi qu'une augmentation de la synthèse des caroténoïdes.

### **2.1.4.3- Phosphore**

Le phosphore est impliqué dans plusieurs voies métaboliques (CHEN *et al.*, 2011). Il représente environ 1% de la matière sèche algale (RICHMOND, 2004). Les microalgues sont capables d'utiliser les formes inorganiques du phosphore ( $PO_4^{3-}$ ,  $H_2PO_4^-$  et  $HPO_4^{2-}$ ) ainsi que ses formes organiques via le phénomène d'hydrolyse grâce à une enzyme de la famille des phosphatases (ALCAINE, 2010).

La carence en phosphore joue sur l'activité photosynthétique principalement au niveau de la fonction de l'enzyme « *rubisco* », indispensable à la fixation du  $CO_2$  (MAZILIAK, 1998; AGREN, 2004), sur l'accumulation des réserves lipidiques (WANG *et al.*, 2008) et sur la productivité en biomasse (BOROWITZKA, 1988). Selon YUN *et al.* (1997) il est nécessaire que le phosphore soit apporté en excès dans le milieu car il forme des précipités avec les ions métalliques et de ce fait pas toute la quantité de phosphore ajoutée est disponible.

### **2.1.4.4- Micro-éléments**

Plusieurs micro-éléments organiques et inorganiques sont nécessaires à la croissance des microalgues, tels le soufre (*S*), le fer (*Fe*), le magnésium (*Mg*), le potassium (*K*), le sodium (*Na*) ; il en va de même pour les oligoéléments tels le cuivre (*Cu*), le manganèse (*Mn*), le zinc (*Zn*), le cobalt (*Co*), le molybdène (*Mo*), etc.

Le soufre est un des éléments essentiels dans la composition de deux acides aminés : la cystéine et la méthionine. Une carence en soufre induit une inhibition de la synthèse protéique et de l'activité photosynthétique des microalgues (WANG *et al.*, 2008).

Une carence en fer entraîne des changements métaboliques cellulaires à travers une diminution de la densité et de la taille cellulaire et une inhibition de la synthèse protéique et lipidique (VALERA *et al.*, 2011 *in* FILLALI, 2012). Cet élément intervient également comme catalyseur lors de la synthèse de la chlorophylle (BECERRA-CELIS, 2009).

Le magnésium est indispensable à l'activité nitrogénase dans le métabolisme cellulaire des microalgues (WANG *et al.*, 2008). On a par ailleurs mis en évidence l'implication du cuivre, du fer et du zinc dans diverses fonctions enzymatiques telles que l'activité de l'anhydrase carbonique, enzyme impliquée dans le mécanisme d'assimilation du carbone (BUITENHUIS *et al.*, 2003 *in* FILLALI, 2012). De même, une carence en cuivre est susceptible d'affecter le mécanisme photosynthétique des microalgues (ROCHAIX, 2001). Une carence en molybdène peut influencer sur le processus métabolique d'assimilation de l'azote au niveau cellulaire (GLASS *et al.*, 2009).

La carence en certains oligo-éléments peut affecter plusieurs voies métaboliques telles que l'accumulation des triglycérides ou « *TAG* » (acide gras indicateur de stress environnemental durant la culture de microalgues) (CHEN *et al.*, 2011). Ces oligoéléments peuvent réagir avec d'autres éléments présents dans le milieu et précipiter ; il est donc souvent nécessaire d'ajouter

un agent chélatant comme l'EDTA « Acide Ethylène Diamine Tétraacétique » afin d'éviter toute limitation en éléments nutritifs dans le liquide (FILLALI, 2012).

#### **2.1.4.5- Salinité du milieu**

Le changement de salinité du milieu induit un stress osmotique et ionique (sel) qui peut se traduire par la formation de précipités et une augmentation de la teneur lipidique des algues. Ainsi, BOROWITZKA et BOROWITZKA (1990 in FILLALI, 2012) ont noté lors du stress ionique chez certaines espèces de *Dunaliella* une augmentation de la concentration en caroténoïdes s'ensuit une inhibition de leur croissance. En outre, selon LU et al. (1999) une augmentation de la salinité induit une inhibition de l'activité photosynthétique.

### **2.2- Production de la biomasse**

La plupart des microalgues sont photoautotrophes, c'est-à-dire qu'elles utilisent le  $CO_2$  et qu'elles tirent leur énergie de la photosynthèse. Or, il existe aussi des microalgues hétérotrophes qui sont capables de se développer sans utiliser l'énergie solaire, mais une source de carbone organique (SADI, 2012).

Le  $CO_2$  absorbé constitue environ 50 % du poids sec de la biomasse microalgale. Ce  $CO_2$  doit être apporté durant la période d'ensoleillement. Ainsi, un intérêt majeur réside dans la valorisation de  $CO_2$  émis par des centrales électriques, par exemple. La production à grande échelle de microalgues requiert une culture continue durant le jour. Les lipides extraits des microalgues peuvent être transformés en biodiésel suivant la réaction classique de transestérification. Les microalgues présentent également la particularité de produire des composés à hautes valeurs ajoutées permettant de rendre économiquement viables les installations (OUELLET, 2013).

Les microalgues et les cyanobactéries peuvent être cultivées en photoautotrophie, en systèmes ouverts ou fermés qui peuvent être de taille et de géométrie variée et utiliser la lumière solaire et/ou artificielle, ou par hétérotrophie, bien connue et maîtrisée depuis des années pour la culture des bactéries (PERSON, 2010).

La culture des microalgues utilisant la lumière du soleil peut être effectuée soit dans des bassins à ciel ouvert ou des photobioréacteurs en forme de tube, rectangle, réacteur à agitation continue ou autres formes. (SADI, 2012).

#### **2.2.1- Culture en photoautotrophie**

##### **2.2.1.1- Systèmes ouverts (Raceways)**

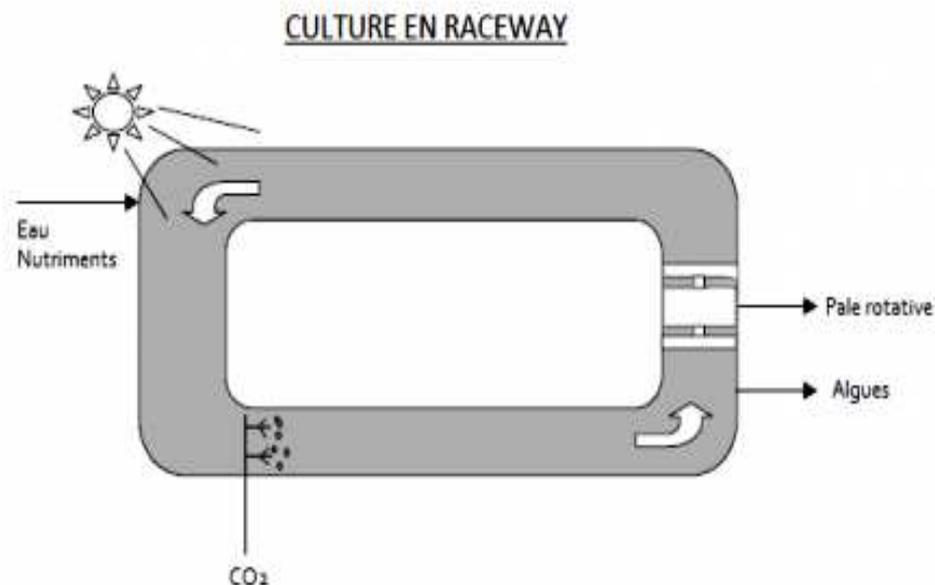
L'évaluation des technologies et leurs rendements de conversion biosynthétique, constitue la base de l'analyse technique du concept. Elle permet d'établir le potentiel de production et

l'éventuelle faisabilité technique mais aussi de juger l'applicabilité pratique des variantes énergétiques du concept algal (DESCHENES, 2009).

Par principe, la culture ouverte nécessite des espèces robustes à la contamination. Elle est également peu contrôlée (maîtrise faible des paramètres physico-chimiques) et très dépendante des variations saisonnières et climatiques (production restreinte aux saisons propices). L'évaporation forte induit une consommation en eau élevée (qui limite néanmoins la montée en température de culture). Ce principe souffre souvent d'une double limitation par la lumière et par l'apport en carbone, du fait d'un contact important avec l'air ambiant (PRUVOST *et al.*, 2011).

Leur forme peut être circulaire ou allongée, unique ou connectée l'un et l'autre. L'eau est généralement maintenue en mouvement par des roues à aube ou des structures en rotation, et un certain mélange qui peut y être accompli par des guides bien conçus (fig. 8) (PERSON, 2010).

Ces étangs sont utilisés lors d'une culture continue, les nutriments sont ajoutés face à la roue à aube et la récolte se fait derrière la roue après un moment de circulation (SADI, 2012). De nouveaux systèmes ouverts notamment améliorés ont été installés en Californie, Hawaii et à Roswell (Nouveau-Mexique). La productivité maximale obtenue est de 50 grammes de microalgues par mètre carré par jour (fig. 8). Ces bons résultats ont été obtenus en utilisant des espèces natives qui se sont naturellement développées dans les étangs. Au contraire, les espèces cultivées au laboratoire ne sont pas si performantes. Des problèmes liés aux basses températures ont été rencontrés, particulièrement la nuit, ce qui a conduit au développement d'une certaine forme de contrôle de température avec la clôture des étangs (BECERRA-CELIS, 2009).



**Figure 8 :** Principe du fonctionnement des systèmes de culture ouverts (raceways) (BECERRA-CELIS, 2009)



**Figure 9** : Culture en Raceways (ANONYME, 2011)

### **2.2.1.2- Systèmes fermés (PBR)**

La culture en milieu isolé de l'extérieur se fait en système appelé « photobioréacteur » (PBR) (fig. 10) (PRUVOST et *al.*, 2011). Il est défini comme un système clos à l'intérieur duquel se déroulent, en présence d'énergie lumineuse, des interactions biologiques que l'on cherche à contrôler en maîtrisant les conditions de culture. Au sein du système, une réaction biochimique de photosynthèse a lieu dans le but de produire de la biomasse végétale à partir de microalgues, de  $CO_2$  et de lumière (OLIVO, 2007).

Les Photobioréacteurs offrent différents avantages: ils permettent la culture des souches microalgales sensibles qui ne pourraient pas faire face aux microorganismes polluants installés dans les systèmes ouverts. Les productivités sont sensiblement plus élevées et peuvent être obtenues par un ajustement des conditions optimales de culture. Les molécules destinées à la fabrication de produits de beauté ou les soins de santé peuvent être produites en respectant les normes de pureté et sûreté du produit. Ainsi, des photobioréacteurs pour la production des molécules pharmaceutiques en suivant les lignes directrices relatives aux bonnes pratiques de fabrication (BPF) ont également été décrites (BECERRA CELIS, 2009).

L'utilisation des photobioréacteurs revient plus chère que les systèmes d'étang à ciel ouvert, cependant ils nécessitent moins de lumière et d'espace pour la culture des microalgues. Les scientifiques préfèrent l'utilisation des photobioréacteurs, car ils assurent la croissance d'une seule espèce d'algue sans qu'elle rentre en compétition avec une autre espèce ou qu'elle soit contaminée (SADI, 2012).

La production des molécules intéressantes justifie l'investissement porté à la culture en photobioréacteur. La culture industrielle de ces microorganismes passe par le développement de photobioréacteurs fermés, stérilisables, contrôlés et à haute productivité (BECERRA-CELIS, 2009).

Il est à noter que le transfert du  $CO_2$  de la phase gazeuse vers la phase liquide est optimisé. Par ailleurs, du fait de la forte productivité des systèmes, l'oxygène doit aussi être éliminé en continu pour éviter des inhibitions de croissance (PERSON, 2010).

La culture des microalgues en milieu clos et plus précisément en photobioréacteurs permet d'obtenir plusieurs sources d'énergie valorisables.



**Figure 10** : Photobioréacteur (PBR) de laboratoire pilote à éclairage externe.

A : PBR solaire Plat (laboratoire GEPEA, 2012. France)

B : PBR Tubulaire (Solar Biofuels Research Centre, Allemagne)

C : PBR Cylindrique (laboratoire de l'Ifremer, France)

### **2.2.2- Culture en hétérotrophie**

Les microalgues de métabolisme hétérotrophe sont principalement cultivées dans des bioréacteurs fermés appelés fermenteurs (SADI, 2012) (fig. 11). Bien que le mot « bioréacteur » recouvre une grande variété de dispositifs, nous pouvons dire qu'il s'agit d'un espace contrôlé contenant des organismes vivants qui interagissent avec différents substrats. En suivant cette définition, nous pouvons trouver les dispositifs de laboratoire (le plus souvent des cultures pures), les bassins artificiels, mais aussi les écosystèmes naturels (lacs ou lagunes).

Ces systèmes sont composés de microorganismes, des substrats nécessaires pour leur croissance (c'est-à-dire *C*, *N*, *K*, *Na*, *Fe*,...), des catalyseurs pour démarrer ou accélérer une réaction et des produits synthétisés par ces microorganismes (BECERRA-CELIS, 2009). Il serait possible de croire que ces microorganismes peuvent utiliser n'importe quelle source d'hydrates de carbone pour remplacer le rayonnement solaire en tant que source d'énergie pour leur métabolisme, alors que tel n'est pas le cas (SADI, 2012).

Cependant, ce système nécessite des souches adaptées au mode de culture, des coûts d'installation et d'investissement importants dus aux réacteurs, et surtout des sources de carbone externes, stérilisées et en quantités équivalentes aux produits générés. Par ailleurs, cette technologie n'est pas adaptée à la production de bioénergie à partir d'énergie solaire. Cette technologie est donc utilisée pour la production de produits de haute valeur ajoutée (molécules organiques), il est à noter que ce système ne permet pas la production de pigments (PERSON, 2010).

Les photobioréacteurs se différencient des bioréacteurs classiques par la nécessité de fournir un substrat additionnel (lumière) en plus des conditions générales de culture (BECERRA – CELIS, 2009).

Les rendements du mode hétérotrophe sont indépendants du rayonnement solaire et ils dépendent des caractéristiques nutritives de leur milieu de culture. L'énergie chimique est répartie dans le volume même du réacteur. Les rendements des systèmes hétérotrophes sont exprimés en gramme par litre de milieu de culture et ils sont calculés sur des périodes variables de croissance (g/ litre/ temps). Mais les rendements des techniques autotrophes sont exprimés en gramme par mètre carré, par période de culture (g/ m<sup>2</sup>/ temps) (DESCHENES, 2009).



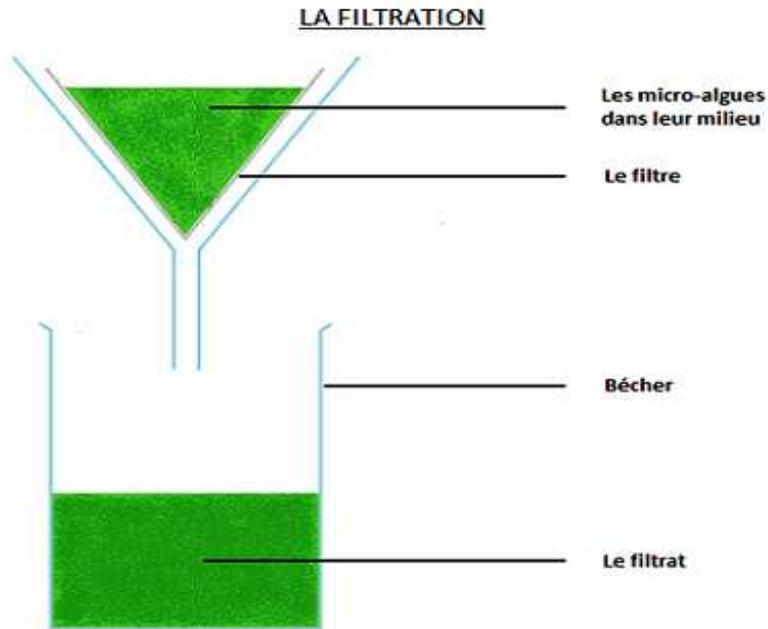
**Figure 11** : Fermenteur de production d'Oméga-3 à partir de microalgues (FERMENATLG, 2013).

### **2.2.3- Récolte des microalgues**

Récolter des cellules de quelques microns de diamètre qui ont une densité proche de l'eau n'est pas une tâche aisée, ce qui rend la récolte de ces dernières difficiles et délicates, car elle consiste à séparer ces micro-organismes du milieu dans lequel ils se trouvent. Cette étape clé est trop souvent passée sous silence et constitue une réelle étape limitante dans une optique de production de biocarburants (CADORET et BERNARD, 2008).

Les techniques de séparation solide-liquide largement employées sont : la centrifugation, la fraction de la mousse, la floculation. Néanmoins, la méthode de la récolte dépend de l'espèce elle-même, de la densité des cellules et souvent des conditions de culture (SADI, 2012).

Ainsi, la filtration peut être utilisée pour récupérer de grandes quantités de biomasse par l'utilisation d'un filtre (fig. 12). Mais pour certaines applications, elle s'avère relativement lente, ce qui peut être insatisfaisant. En effet, ce procédé est plus adapté pour les grandes microalgues telles que *Coelastrum proboscideum* et *Spirulina platensis* mais ne peut pas récupérer les plus petites comme *Scenedesmus*, *Dunaliella* et *Chlorella* (ANEX, 2012).



**Figure 12 :** Principe de la filtration (ANEX, 2012)

Pour les microalgues, c'est la centrifugation qui est le procédé le plus efficace (ANEX, 2012). C'est une technique qui utilise la force centrifuge, c'est à dire l'action sur le nombre de  $g$  : l'intensité gravitationnelle, pour séparer des particules solides en suspension dans un fluide, ici les algues en suspension dans leur milieu de culture. L'appareil utilisé pour réaliser cette séparation est la centrifugeuse (fig. 13), qui permet de séparer les éléments du mélange en les faisant tourner à grande vitesse (PERSON, 2010). Cette technique est toutefois considérée comme étant trop dispendieuse et énergivore pour la production d'algocarburants (SADI, 2012).



**Figure 13 :** Centrifugeuse modèle *Hettich*. (ANONYME, 2006)

La floculation et l'autofloculation sont aussi des méthodes communément utilisées pour concentrer les microalgues. La floculation est réalisée grâce à l'ajout de floculants tels le chlorure d'aluminium et de fer. Ces floculants permettent l'agglomération de la biomasse algale qui, étant donné sa densité plus élevée, précipitera et pourra être facilement récoltée (fig. 14). L'autofloculation consiste en l'induction d'un stress tels un pH extrême, une augmentation ou une diminution de la température optimale ainsi qu'une modification de la concentration en nutriments qui entraîneront une floculation de façon naturelle des microalgues (CANTIN, 2010).

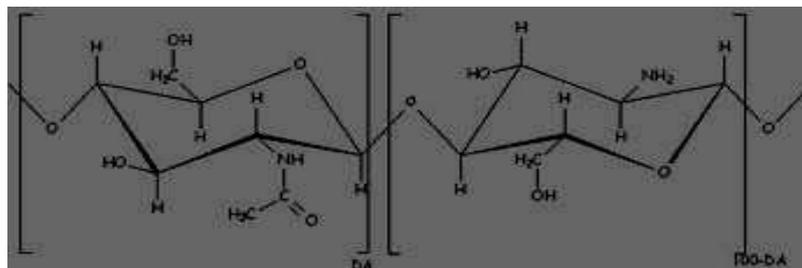


Flacon de Gauche : Avant floculation  
Flacon de Droite : Après floculation

**Figure 14 :** La floculation (ANONYME, 2014)

Certaines souches peuvent avoir une tendance naturelle à flotter, en particulier celles riches en lipides. Pour les autres le phénomène de flottation est produit par une action sur la différence de masse volumique et le diamètre des cellules (PERSON, 2010).

D'autres techniques plus naturelles comme l'utilisation de molécule organique d'origine naturelle exemple : le *Chitosan* sont utilisées (fig. 15). Toutefois, hormis leur avantage certain puisque compatible avec la nutrition humaine et animale, avec la cosmétique et la pharmacologie, leur prix ainsi que leur disponibilité restent inabordables.



**Figure 15 :** floculant naturel le *Chitosan* (ANONYME, 2014)

Aujourd'hui, nous assistons chaque jour à la naissance de techniques plus innovantes les unes des autres. Ainsi, des laboratoires de recherche ont mis au point une nouvelle technique de floculation dite l'Electrofloculation, qui consiste en l'envoi de pulses électromagnétiques pour déstabiliser les charges superficielles des microalgues ce qui provoque leur floculation (fig. 16). C'est une technique toujours au stade recherche développement dont seul l'avenir nous dira si elle fut bénéfique car au stade actuel elle reste énergivore surtout dans le cas d'une production à grande échelle.



**Figure 16 :** Electrofloculation des microalgues (CABATUANDO et *al.*, 2011).

#### **2.2.4- Séchage de la pâte algale**

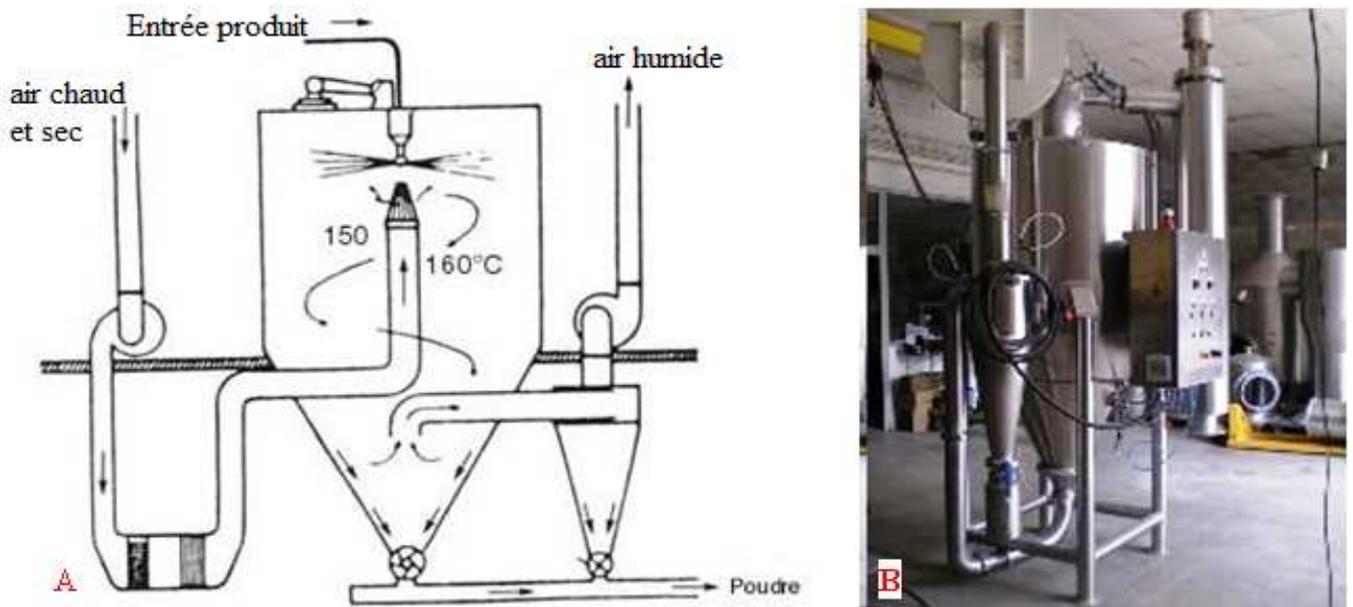
Certains procédés demandent la déshydratation de la biomasse qui augmente également sa durée de vie et celle du produit final. Plusieurs méthodes ont été employées pour le séchage des microalgues telles que *Chlorella*, *Scenedesmus* et *Spirulina* (RICHMOND, 2004).

Ces procédés courants sont le séchage par atomisation, le séchage dans des tambours, la lyophilisation et le séchage au soleil. En raison de la teneur élevée en eau de la biomasse algale, le séchage au soleil n'est pas une méthode très efficace pour la production de poudre d'algues et celui fait par atomisation, n'est pas économiquement faisable, pour les produits de faible valeur comme les biocarburants (ANEX, 2012).

Le séchage par atomisation est une méthode de déshydratation d'un liquide (jus, lait, ...) sous forme de poudre par passage dans un flux d'air chaud. Lors de la déshydratation par atomisation, le liquide est pulvérisé en fines gouttelettes, dans une enceinte cylindrique verticale au contact d'un courant d'air chaud afin d'évaporer l'eau. La poudre obtenue est

entraînée par le flux de chaleur jusqu'à un cyclone où un filtre à manche va séparer l'air de la poudre (PERSON, 2010) (fig. 17).

Le séchage par lyophilisation consiste à ôter l'eau d'un produit liquide, pâteux ou solide, à l'aide de la surgélation puis une évaporation sous vide de la glace sans la faire fondre (sublimation). La vapeur d'eau quitte le produit puis est capturée par congélation à l'aide d'un condenseur, ou d'un piège à froid. Cette technique permet de conserver à la fois le volume, l'aspect et les propriétés du produit traité. Cette technique reste la plus consommatrice en énergie (PERSON, 2010).



**Figure 17** : Séchage par atomisation.

A : Schéma détaillé du procédé d'atomisation (CHEFTEL et BESSANCON, 1977).

B : Tour de séchage pilote (ANONYME 2010).

### 2.3- Application des microalgues

Outre l'intérêt écologique considérable comme agent épurateur des eaux usées, les algues microscopiques jouent un rôle important dans de nombreux domaines (fig. 18) : elles sont utilisées en agriculture comme engrais biologique pour la fertilisation des sols pauvres, en particulier les sols sahariens squelettiques, dont la structure est amoindrie par l'abondance des ions sodium dans l'eau d'irrigation, ce qui engendre des conditions asphyxiantes très défavorables ; ainsi l'apport d'algues microscopiques riches en azote à ce type de sol, peut corriger l'insuffisance en matières organiques.

Par ailleurs, les microalgues constituent également un gisement prometteur de molécules d'intérêt pour de nombreux secteurs d'activité tels que la santé, la pharmacie, la parapharmacie, la cosmétologie, l'agroalimentaire et la chimie. Les molécules extraites des algues sont de

nature très variée et possèdent de nombreuses activités reconnues (ex. antioxydant, anti-inflammatoire, cytotoxique et antimicrobien).

Ces mêmes algues représentent une source potentielle de protéines alimentaires non négligeable (50 à 60 % du poids sec) pour l'homme et l'animal qu'il soit terrestre ou aquatique. En effet, ces organismes sont considérés comme le premier maillon de la chaîne alimentaire (phytoplancton) pour les producteurs secondaire (poissons, crustacés, ...) ; elles représentent indéniablement le nutriment essentiel en aquaculture (croissance et développement des poissons).

**Tableau III** : Les différents domaines de valorisation des microalgues (A.R.V.A.M.)

<b>VALORISATION DES MICROALGUES</b>		
<b>NUTRITION</b>	<b>SANTE</b>	<b>COSMETIQUE</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nutraceutiques,</li> <li>• Complément alimentaire,</li> <li>• Aquaculture</li> <li>• Nutrition animale,</li> <li>• Colorants naturels</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Omega-3 (OHA, EPA),</li> <li>• Antioxydant,</li> <li>• Marqueurs fluorescents,</li> <li>• Molécules recombinantes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antioxydant,</li> <li>• Photoprotection,</li> <li>• Régénération cellulaire,</li> <li>• Colorants naturels</li> </ul>
<b>ENERGIE</b>	<b>ENVIRONNEMENT</b>	<b>CHIMIE</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Algoturants,</li> <li>• Bioéthanol,</li> <li>• Biométhane</li> <li>• Production H<sub>2</sub></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biomitigation du CO<sub>2</sub>,</li> <li>• Bioremédiation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Source de Synthons,</li> <li>• Colorants naturels,</li> <li>• Molécules naturelles</li> </ul>

Malgré le potentiel biotechnologique incroyable de cette ressource, les microalgues sont encore très peu exploitées ; seulement quelques espèces sont commercialisées actuellement (tab. IV).

**Tableau IV :** Les principales espèces de microalgues commercialisées

<b>Espèces</b>	<b>Produits</b>	<b>Exemples d'applications</b>
<i>Aphanizomenon flosaquae</i>	β-carotène	Nutrition
<i>Arthrospira</i> (ou Spiruline)	Phycocyanine, Biomasse	Complément alimentaire, Nutrition, Cosmétique
<i>Chlorella</i>	Biomasse	Complément alimentaire, Nutraceutique, Complément alimentaire, Nutrition animale
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	PUFA* Oméga 3	Nutraceutique, Complément alimentaire
<i>Dunaliella salina</i>	β-carotène, Astaxanthine	Nutraceutique, Pharmaceutique, Nutrition animale
<i>Haematococcus pluvialis</i>	β-carotène, Astaxanthine	Nutraceutique, Pharmaceutique, Nutrition animale
<i>Isochrysis galbana</i>	PUFA* Oméga 3, 6	Nutrition animale, Aquaculture
<i>Nannochloropsis</i>	Biomasse	Aquaculture, Algocarburants
<i>Odontella aurita</i>	PUFA* Oméga 3	Nutraceutique, Pharmaceutique, Cosmétique
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Lipides, PUFA*	Nutrition, Aquaculture, Algocarburants
<i>Porphyridium cruentum</i>	Polysaccharides	Pharmaceutique, Cosmétique, Nutrition
<i>Shizochytrium</i>	PUFA* Oméga 3	Nutraceutique

\*PUFA: polyunsaturated fatty acids (acides gras polyinsaturés) (source: A.R.V.A.M.)

### 2.3.1- Domaine alimentaire

L'utilisation des microalgues comme source de nourriture vient des pratiques ancestrales de populations sujettes à la famine. Les chinois utilisaient la microalgue *Nostoc commune* pour

assurer leur alimentation il y a plus de 2000 ans. Actuellement, la plus connue dans ce domaine est une microalgue appelée *Arthrospira platensis*, ou Spiruline (BECERRA – CELIS, 2009).

Aujourd'hui, environ 145 de ces végétaux aquatiques entrent dans la catégorie des microalgues alimentaires, 36 % appartiennent aux Chrysobiontes, 48 % aux Rhodobiontes, 15 % aux Chlorobiontes et 1 % aux Cyanobiontes, et trois types de microalgues parmi ce panel couvrent à elles seules 99 % de la demande mondiale : les algues rouges *Porphyra*, la Chrysobionte *Laminaria japonica* et une algue brune *Undaria pinnatifida* de la famille des Alariacées, plus communément connue sous la dénomination de Fougère de mer (PIERRE, 2010).

C'est dans un contexte de pénurie alimentaire en 1940 que les chercheurs se sont intéressés aux microalgues en tant qu'aliments, à cause de leur teneur en protéines. La première installation industrielle a vu le jour dans les années 1960 au Japon et, dès les années 1980 l'Asie produit une vingtaine de tonnes par an principalement le genre *Chlorella* (JENCK et al., 2011) (fig. 19a).

Les protéines sont d'une importance majeure dans la nutrition humaine, Certaines algues contiennent jusqu'à 60 % de protéines. La cyanobactérie *Arthrospira* est une algue célèbre, actuellement cultivée pour sa forte teneur en protéines (PERSON, 2010) (fig. 19b).

Les microalgues sont considérées comme une source potentielle d'oméga 3 et 6 utilisés en nutrition humaine et animale.

En outre, les microalgues ont un potentiel intéressant dans la production de pigments. Le carotène est un colorant, actuellement extrait de *Porphyridium cruentum*, qui sert notamment à colorer la margarine (DABBADIE, 1992), et comme additif dans l'alimentation animale (pour donner une couleur orangée à la chair du poisson et au jaune d'oeuf de la poule) (BECERRA – CELIS, 2009).

Une autre microalgue qui est toute aussi bien représentée est *Dunaliella salina* et qui en est la plus riche en polysaccharides utilisés en tant qu'agent gélifiant ou épaississant tel que le  $\beta$  carotène. Le glycérol (molécule intervenant dans les systèmes d'osmorégulation des microalgues), est exploité dans l'agroalimentaire comme édulcorant et c'est l'algue *Dunaliella salina* qui est la plus riche (FILALI, 2012).

Les microalgues peuvent être intégrées à l'alimentation en aquaculture marine (GHOBRINI et al., 2014). Elles sont essentielles au cours des processus d'éclosion et de nurserie de mollusques bivalves, crevettes, et quelques élevages de poissons. Les microalgues sont également utilisées pour produire du zooplancton, généralement des rotifères, qui sont donnés comme nourriture aux poissons carnivores fraîchement éclos (PERSON, 2010). De même qu'elles apparaissent également comme de bons fertilisants des sols pauvres puisqu'elles apportent notamment du potassium, de l'azote et des éléments essentielles à la croissance végétale (GHOBRINI et al., 2014).



**Figure 18** : Formes nutritives des microalgues.(ANONYME, 2011)

A : La Chlorelle (*Chlorella vulgaris*)

B : La Spiruline (*Arthrospira Platensis*)

### 2.3.2- Domaine pharmaceutique

Au vu de leur grande diversité biochimique, les microalgues représentent une source intéressante de molécules bioactives et de toxines utilisables dans le développement de nouveaux médicaments (FILALI, 2012). Ainsi plusieurs études ont permis de mettre en évidence l'implication des microalgues dans le domaine pharmaceutique par l'identification de nouvelles molécules naturelles (GHOBRIINI et *al.*, 2014).

Les microalgues contiennent une multitude de pigments associés au captage de la lumière incidente. Les caroténoïdes issus des microalgues présentent déjà de nombreuses applications sur le marché (PERSON, 2010).

Les caroténoïdes ont des propriétés intéressantes en termes de protection par rapport à certaines pathologies. Un effet thérapeutique préventif vis-à-vis du cancer est aussi parfois attribué à ces molécules. Par contre, les phycobiliprotéines sont largement utilisées dans des laboratoires en immunologie. En effet, leurs propriétés en font des réactifs fluorescents hautement sensibles et très puissants (BECERRA-CELIS, 2009).

Le  $\beta$ -carotène est un pigment synthétisé par l'algue *Dunaliella* (FILALI 2012), ce caroténoïde précurseur de la vitamine A est un antioxydant (JENCK et *al.*, 2011).

Le criblage d'extraits de microalgues par les industries pharmaceutiques et les laboratoires de recherches dans le domaine médicale afin d'identifier des molécules actives et des médicaments potentiels est en plein essor. Des molécules telles que la *tubercidine*, une molécule cytotoxique, a été identifiée chez la microalgue *Tolythrixbyssoides* ainsi que chez les cyanobactéries. Elle présente une action effective *in vitro* contre un type de leucémie lymphoïde (FILALI 2012).

Diverses microalgues marines produisent naturellement des acides gras polyinsaturés (AGPI) (JENCK et al., 2011). Les (AGPI) sont connus pour jouer un rôle important dans la réduction des maladies cardio-vasculaires, l'obésité, le métabolisme des cellules comprenant la régulation de la fluidité membranaire, le transport des électrons et de l'oxygène, ainsi que la capacité d'adaptation thermique (PERSON, 2010).

De plus, la présence des glycolipides comme les acides gras polyinsaturés à longues chaînes leur permettent d'entrer sur le marché des réactifs biochimiques et de la recherche médicale grâce aux propriétés anti VIH prometteuses (BECERRA – CELIS, 2009).

### **2.3.3- Domaine cosmétique**

Les extraits d'algues sont régulièrement utilisés dans des crèmes cosmétologiques. Certaines molécules d'origine algale sont même utilisées en tant qu'excipient dans l'élaboration de produits dermatologiques (alginates).

De nombreuses recherches tendent à valoriser l'utilisation des algues, notamment à la vue des enjeux économiques considérables liés aux produits cosmétologiques d'appellation biologique (PIERRE, 2010).

A cet effet, des extraits d'algues, ayant une activité antioxydante, sont exploités sur le marché dans la fabrication des produits de soin capillaire, du visage et de la peau ainsi que dans les crèmes solaires (FILALI, 2012).

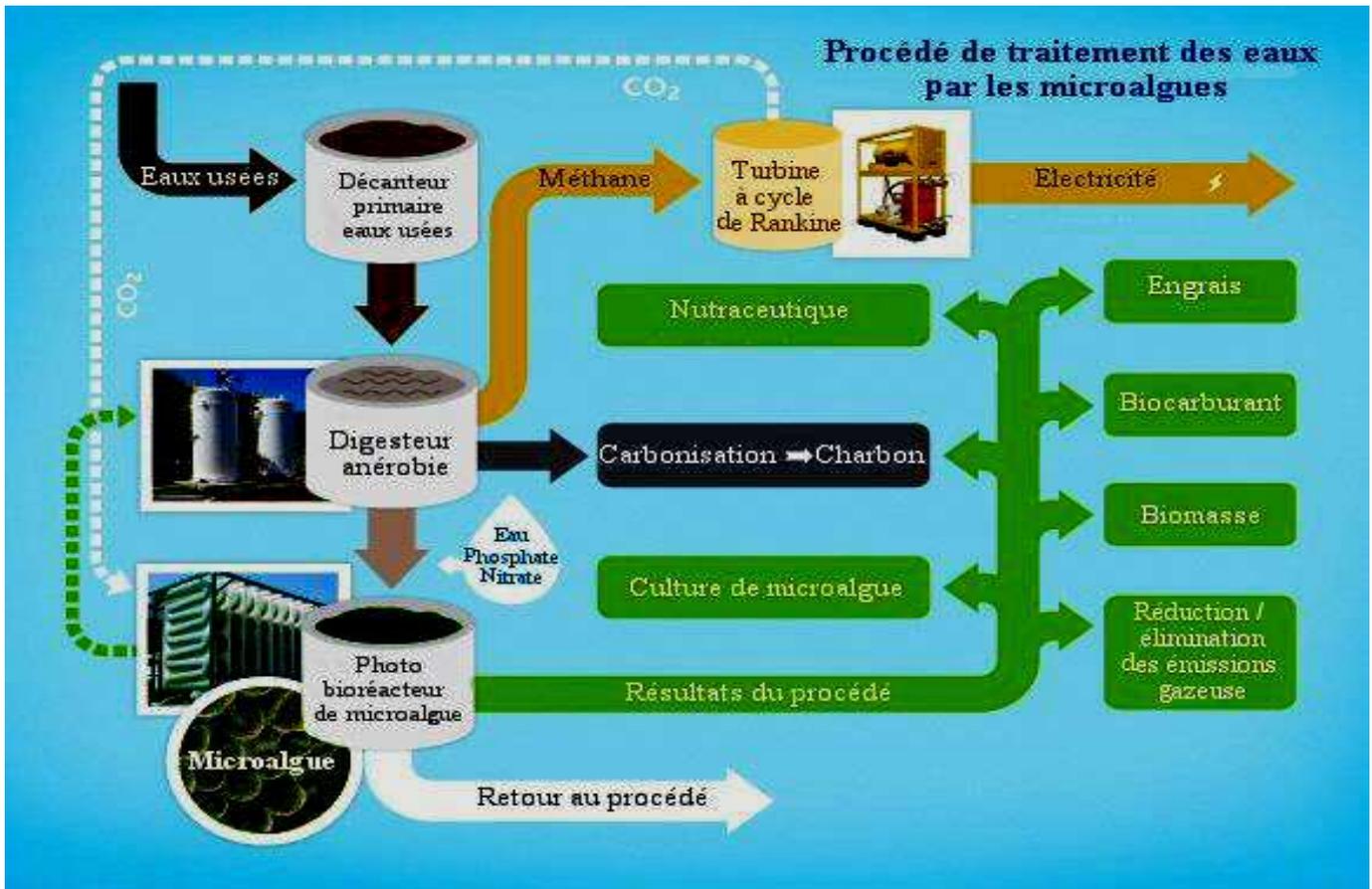
La dermochlorine extraite de la microalgue *Chlorella vulgaris*, permet de densifier et protéger le collagène et l'élastine du visage. Ce produit améliore par ailleurs la régénération des cellules du derme, le rendant incontournable dans les produits cosmétiques anti-rides (PIERRE, 2010).

Aussi, des extraits protéiques de la souche *Arthrospira* entraînent une réparation des premiers signes de vieillissement de la peau.

Par ailleurs, les pigments issus des microalgues sont également utilisés dans le domaine cosmétique (FILALI, 2012).

### **2.3.4- Domaine environnemental**

L'utilisation des microalgues dans le secteur de l'environnement s'intègre dans une optique de dépollution avec pour idée de transformer nos déchets en produits ; comme par exemple le traitement des eaux usées chargées en nitrates, phosphates, l'épuration d'effluents gazeux contenant du  $CO_2$  mais aussi divers oxydes  $NO_x$ ,  $SO_x$ , et la bioremédiation possible des sites pollués... (fig. 19) (PERSON, 2010).

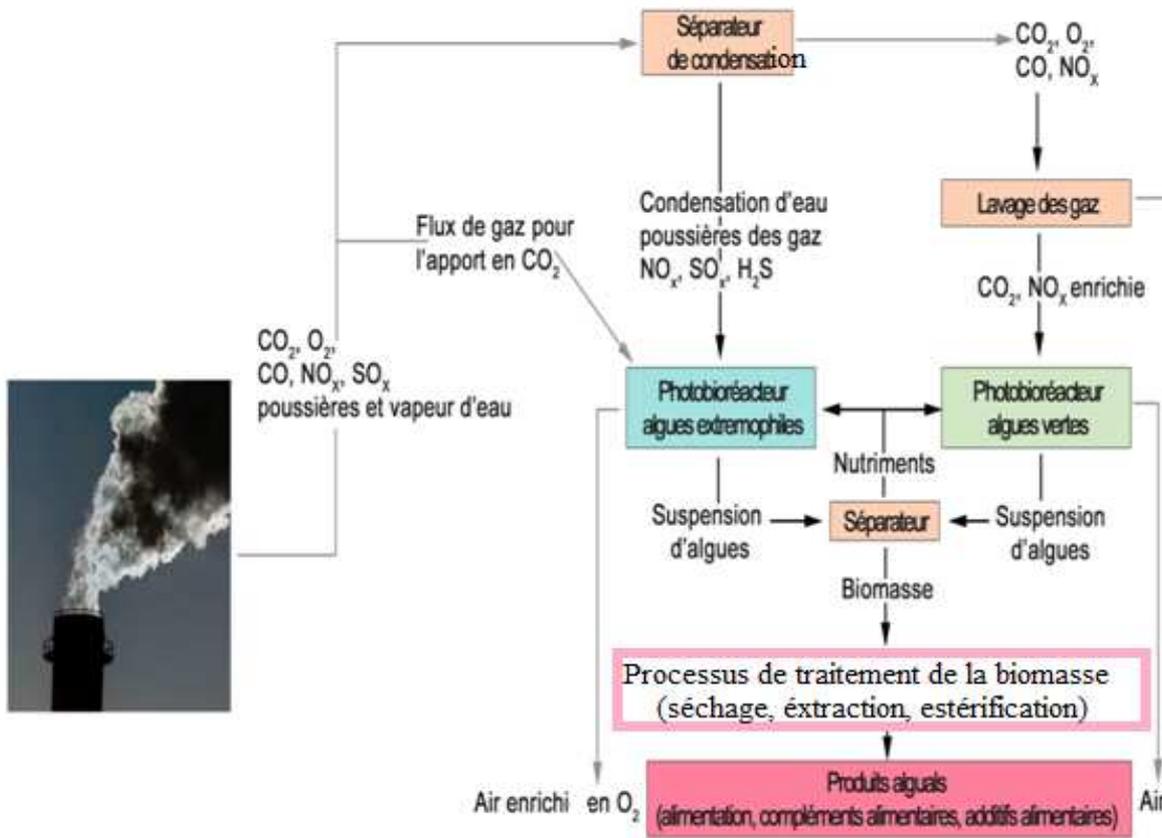


**Figure 19 :** Procédé de traitement des eaux par les microalgues (FILALI, 2012)

Au vu de leur capacité d'assimilation de nombreux nutriments nécessaires à leur croissance, les microalgues représentent une solution intéressante pour éliminer ces éléments ; elles sont également capables de fixer des métaux lourds. Elles sont ainsi les principaux éléments biologiques de certains systèmes de traitement des eaux municipales et industrielles (essentiellement traitement tertiaire). Grâce à l'absorption de l'azote et du phosphore, elles contribuent à réduire le phénomène d'eutrophisation de certains milieux aquatiques (FILALI, 2012).

Pour éviter la pollution de la nappe phréatique, il est possible de cultiver des algues à partir de ces déchets organiques, et de les épandre ensuite par l'eau d'irrigation. Les matières organiques contenues dans les algues établiront alors des liaisons avec les argiles du sol en formant un complexe argilo-humique qui ne libérera ses matières minérales que très progressivement, préservant ainsi la nappe phréatique (DABBADIE, 1992).

Les centrales thermiques, les cimenteries, les raffineries sont très productrices de  $CO_2$ . Les microalgues produisent de l'énergie tout en consommant du carbone créant ainsi des bénéfices environnementaux, mais également des retombées économiques pour les entreprises polluantes (fig. 20) (PERSON, 2010).



**Figure 20 :** Représentation schématique du procédé de fixation de CO<sub>2</sub> par les microalgues à partir de gaz d'échappement industriel (FILALI 2012).

La biomasse algale est connue pour améliorer la composition minérale des sols et leur capacité de liaison avec l'eau. Ce sont les cyanobactéries qui, grâce à leur capacité de fixer l'azote gazeux, contribuent à maintenir la fertilité des écosystèmes naturels ou de cultures. Leur présence dans les champs de riz améliore la qualité des récoltes. Malgré tout, c'est une technique qui n'a pas été adoptée largement par les agriculteurs mais qui mérite d'être reconsidérée et améliorée. Par exemple, au Japon, *Chlorella vulgaris*, est utilisée pour stimuler la biosynthèse de chlorophylle ce qui améliore la croissance des plantes. Elle est aussi considérée comme un engrais car elle favorise la croissance d'actinomycètes et des bactéries utiles dans le sol (BECERRA – CELIS, 2009).

### 2.3.5- Domaine énergétique

Aujourd'hui, nous avons besoin des biocarburants pour remplacer les carburants d'origine pétrolière utilisés pour les transports. Ces derniers contribuent au réchauffement climatique et constituent une ressource épuisable (CHISTI, 2007). Les biocarburants obtenus à partir de

matériaux organiques renouvelables se présentent comme une alternative aux énergies d'origine fossile pour réduire les émissions de gaz à effet de serre (GES) et assurer une indépendance énergétique (BECERRA CELIS, 2009).

Le concept algal repose sur le principe de capter et de concentrer des formes renouvelables diffuses et irrégulières d'énergie comme le rayonnement solaire ou l'énergie chimique de certains rejets en les convertissant en biomasse algale, une forme stable et concentré d'énergie. De la biomasse algale, il est possible d'extraire des biocarburants, une forme concentrée, stable et polyvalente d'énergie (GHOBRIINI *et al.*, 2014).

La valorisation de la biomasse algale peut se traduire par la production de bioénergie sous forme d'électricité et/ou de chaleur par combustion directe, ou sous forme de biométhane après méthanisation ou sous forme de biocarburant ou d'hydrogène. Cependant, cette valorisation ne sera concurrentielle qu'avec une forte productivité de biomasse, une possibilité de récolte mécanique simple et un coût de production plus réduit que les procédés mettant en œuvre d'autres types de biomasse (FILALI, 2012).

Le potentiel des microalgues pour la mise en place de nouvelles filières de bioénergie, à partir de leurs constituants polysaccharidiques (bioéthanol, biogaz) ou lipidiques (biodiesel, biokérosène) ou même directement de leur biomasse (voie thermochimique classique) est lié à leur grande biodiversité non encore complètement explorée, à leur productivité espérée et au fait que leur production n'entre pas en compétition avec les cultures vivrières (fig. 21).



**Figure 21** : Procédés de production de biocarburant via microalgues (FILALI 2012).





Matériels et méthodes

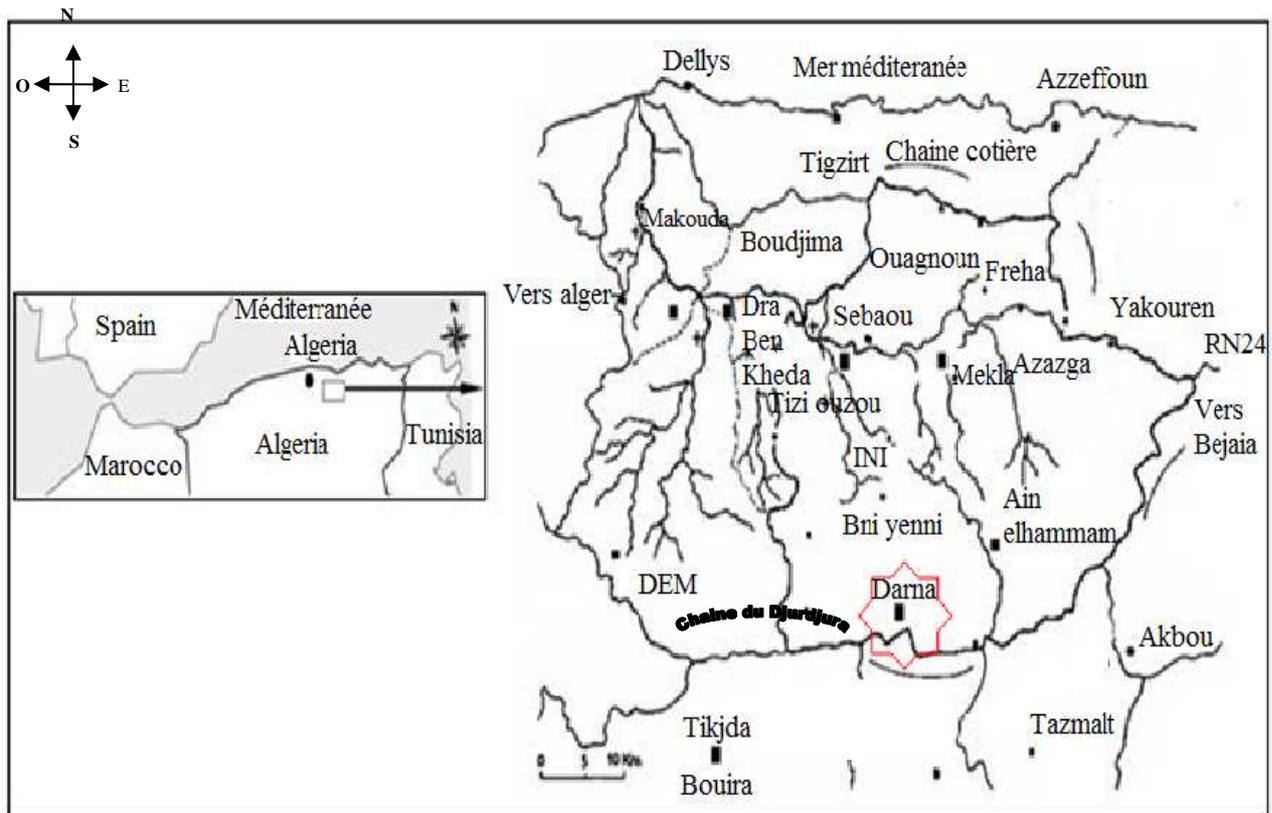
### 3- Expérimentation

Les expérimentations ont été effectuées au laboratoire de cytologie expérimentale et de morphogenèse végétale du Pr. YAKOUB-BOUGDAL, faculté de médecine, département de pharmacie, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

Les essais ont porté sur la sélection des souches du *Chlorelles* isolées à partir de lots de microalgues échantillonnées localement.

#### 3.1. Echantillonnage et zone de prélèvement

Les prélèvements ont été menés au niveau d'Assif el Hammam, situé dans la forêt de Darna, commune d'Iboudrarene, Daïra de Béni Yenni (versant nord du parc national du Djurdjura) Sud Est de la wilaya de Tizi-Ouzou. Le site d'étude se situe à une altitude de 760 m, avec pour coordonnées angulaires 36°28'-36,30' de latitude Nord et 4°15'- 04,17' de longitude Est (fig. 23).



**Figure 22** :Localisation géographique de la région d'étude (AMROUN *et al.*, 2011).

### **3.1.1- Généralités sur le site d'étude**

#### **a- Présentation du relief**

La forêt de Darna comporte deux zones physiques bien distinctes :

- Une zone de montagnes délimitée et abritant l'essentiel des agglomérations villageoises.
- Une zone de vallées correspondant à l'Oued irriguant la commune d'Assif el-Hammam en contre bas du village de Darna.

La région de Darna est également caractérisée par trois crêtes rocheuses : Adrar Ait Darna, Lemdhella, Tizi Oughilas (OUBELLIL 2011).

#### **b- Hydrologie**

La région d'étude est caractérisée par un chevelu hydraulique varié comportant de petits ruisseaux (Ighzer Lahouana, Ighzer Bounsef, Ighzer Nassaâka...) et des Oueds (Assif El Hammam et Thassift Ath Boudrare). Nous signalons aussi la présence d'un petit barrage qui alimente l'usine hydroélectrique d'Assif El Hammam au Nord du site d'étude. La région possède de nombreuses sources dont le régime d'écoulement est irrégulier.

Cette diversité des réseaux hydrographiques confère à la forêt de Darna une grande diversité du relief et une végétation caractéristique (OUBELLIL 2011).

#### **c- Climat**

Le Djurdjura est soumis à un climat de type méditerranéen. Ce milieu forestier de montagne est caractérisé par deux saisons bien tranchées :

- La saison froide coïncidant avec la période pluvieuse.
- La saison sèche coïncidant avec la période chaude dont la durée moyenne est de deux mois.

Au Djurdjura la neige persiste sur les sommets depuis le mois de novembre jusqu'à la fin du mois de Mai.

Par manque de données relatives aux températures de la station de Darna, nous avons eu recours sur la base de gradient thermique aux températures de la région Ait Aubane situant sur la même altitude.

Le tableau suivant rassemble les valeurs des températures relevées mois par mois pour la région d'étude (MERABET, 2014).

**Tableau V:** Températures maximales, minimales et moyennes mensuelles de l'année 2013 pour la région d'étude.

Mois	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
<b>M</b> (°C)	10,0	10,2	14,6	18,8	23,0	27,6	32,4	32,8	27,5	20,1	14,7	10,8
<b>m</b> (°C)	3,9	2,6	9,5	12,5	15,9	20,2	24,5	24,5	20,2	15,5	10,3	7,4
<b>T.moyenne</b> (°C)	6,95	6,4	12,1	15,7	19,4	23,9	28,5	28,9	23,9	18,5	12,9	9,1

(O.M.S, 2013)

**M** : la moyenne mensuelle des températures maxima.

**m** : la moyenne mensuelle des températures minima.

**T.moyenne** : la moyenne des températures mensuelles.

Les prélèvements ont été effectués dans les principaux points : début de l'Oued, le long et les retenues spontanées de l'eau (fig. 24).



**Figure 23 :** Zone de prélèvement du cours d'eau d'Assif El Hammam (Originale, 2014).

### **3.2- Méthode de prélèvement**

Les prélèvements ont été réalisés en Avril 2014 dans le cours d'eau à des profondeurs allant de 0 à 20 cm. À chaque point de la récolte, 3 échantillons de 250 ml sont prélevés par trois points de prélèvement différents pour des analyses biologiques.

### **3.3- Matériel**

#### **3.3.1- Matériel végétal**

Nos travaux de culture *in vitro* porteront sur les cellules des chlorelles genre *Chlorella*, échantillonnées au niveau d'Assif el Hemmam de la forêt de Darna.

#### **3.3.2- Matériel de culture *in vitro***

La culture *in vitro* doit être totalement aseptique, ce qui implique la stérilisation préalable du matériel suivant:

La verrerie : béchers, Erlen Meyers (1L et 2L), 12 boîtes de pétri, pipettes graduées (1ml et 10 ml), entonnoirs, des anses et des flacons sombres pour sauvegarder les solutions mères du milieu de culture.

L'appareillage utilisé est le suivant: étuve, hotte à flux laminaire horizontal, balance de précision, cocotte-minute, chambre de culture, réfrigérateur, plaque chauffante dotée d'un agitateur, becs bunsen, appareil à photos.

### **3.4- Protocole suivi**

L'expérience que nous avons faite a été réalisée en trois majeures parties :

➤ Observation microscopique

- Lors de cette étape, nous avons essayé de déterminer les souches de chlorelles par observation microscopique à l'aide d'un microscope photonique, et les identifier selon leurs couleur et caractéristiques morphologiques, puis prendre des photos.
- Nous avons aussi essayé de comparer la concentration des chlorelles par point de prélèvement, celle qu'on a trouvé plus importante dans l'échantillon issu des retenus spontanés du cours, en raison de leur accumulation en cet endroit.

Identification des meilleurs facteurs pour le bon développement de ces microalgues à savoir le milieu de culture favorable pour leur croissance et la stérilisation du matériel utilisé :

La verrerie doit être stérilisée comme suit :

- Lavage avec l'Isis liquide puis rinçage abondant à l'eau courante.
- Un autre lavage avec l'eau de javel (pendant 5 min).
- Rinçage abondant avec l'eau distillée stérile.
- Couverture avec du papier kraft pour chacun.
- Mettre à l'étuve pendant 30 mn à 140°C.
- La blouse aussi doit être propre stérilisée par les UV.

La chambre d'ensemencement :

- La hotte, la paillasse ainsi que le sol, tout est aseptisé par un premier passage avec l'eau de javel, suivi d'un 2<sup>ème</sup> passage à l'aide d'un chiffon imbibé d'alcool sur toutes les surfaces.
- Allumage des UV la veille de l'ensemencement.

➤ Préparation du milieu de culture

Au cours de cette étape on a préparé deux milieux de base spécifiques pour la culture des chlorelles : BB (Bod's Basal) et BG11.

➤ Mise en culture

Dans cette dernière partie, nous avons cultivé les chlorelles *in vitro*, tout en respectant les conditions de stérilisation pour une meilleure production de biomasse algale.

### **3.5- Isolement et culture**

Dans notre cas, on s'intéresse plus particulièrement aux souches microalgales unicellulaires. Nous avons opté pour la méthode d'obtention de culture pure, basée sur le principe des suspensions dilutions et repiquages répétés sur boîtes de Pétri.

La méthode d'isolement se fait sur milieu solide BG11 spécifique pour la culture de Chlorophyceae et des Cyanophyceae (CHADER, 2009; GHOBINI *et al.*, 2014).

La composition chimique du milieu est représentée dans le Tableau IV. Le pH est ajusté à 7 avant autoclavage et solidifié avec de l'agar à 7g.l<sup>-1</sup>.

Par ailleurs, les éventuelles contaminations par les bactéries et les champignons sont évitées par le maintien de conditions aseptiques et le travail sous la hotte à flux laminaire horizontale.



**Figure 24** : Hotte à flux laminaire horizontale.(Anonyme, 2014)

La purification des souches est basée sur le principe des repiquages successifs sur boîtes de pétri contenant le même milieu. Les colonies correspondantes aux chlorelles ont été prélevées et étalées sur de nouvelles boîtes de Pétri et incubées à  $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$  sous une photopériode de jour long (16h lumière/ 8h d'obscurité) et une intensité lumineuse de 3000 lux.

Cette opération sera répétée quatre fois avec des observations régulières sous microscope photonique, pour s'assurer de l'isolement des colonies correspondant à une souche de *chlorella*.

**Tableau VI** : Milieu de culture BG 11 ( $\text{g l}^{-1}$ )

Composés	Solution mère ( $\text{g.l}^{-1}$ )
<b><u>Macroélément :</u></b>	
NaNO <sub>3</sub>	1.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	0.04
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.075
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.036
Acide citrique	0.006
Citrate ferrico-ammoniaque (C <sub>6</sub> H <sub>5+4y</sub> Fe <sub>x</sub> N <sub>y</sub> O <sub>7</sub> )	0.006
EDTA	0.001
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.02
<b><u>Trace metal mix A5 :</u></b>	
	2.86
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.81
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	0.222
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.079
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.39
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>2</sub> 4 H <sub>2</sub> O	0.049
Cl <sub>2</sub> Co 6H <sub>2</sub> O	

### 3.2.2- Identification

Les échantillons d'algues purifiées ont été observés au microscope et les propriétés morphologiques des isolats ont été identifiées sur la base des manuels et les clés de détermination de VAN VUUREN (2006); LEE (2008) et BELLINGER et SIGEE (2010).

### 3.2.3- Culture des chlorelles

La phase de croissance et celle de la formation de biomasse algale de la souche de chlorelle isolée se fait en culture discontinue (batch, milieu non renouvelé) sur le milieu

Bold's Basal (BOLD, 1949) spécifique pour la culture des Chlorelles, additionné de  $2.5 \text{ g.l}^{-1}$  de glucose, (voir composition Tab. V).

La phase de croissance a été menée sur une période de 3 semaines dans un Erlen Meyer de 500 ml. Ce dernier contenant les chlorelles, le milieu de culture BB (250ml) et une barre magnétique à l'intérieur, a été disposé sur une plaque chauffante pour assurer une agitation en continu de 137 rpm (fg.25).



**Figure 25 :** Dispositif de production de biomasse en culture discontinue sur le milieu BB

Une culture de  $8 \times 10^6$  cellule/ml est alors incubée à  $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$ , sous une intensité lumineuse de 3000 lux et une photopériode de jour long (16h/ 8h). Cette étape a pour but d'adapter notre souche de microalgue au milieu de culture (BB) avant la phase de la production de biomasse.

Tableau VII: Milieu de culture Bold's Basal (BB)

Composés	Quantités (g · L <sup>-1</sup> dH <sub>2</sub> O)	Solutions mères
<i>Macronutrients</i>		
NaNO <sub>3</sub>	25.00	10 mL
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	2.50	10 mL
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	7.50	10 mL
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7.50	10 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17.50	10 mL
NaCl	2.50	10 mL
<i>Alkaline EDTA Solution</i>		
EDTA	50.00	1 mL
KOH	31.00	
<i>Acidified Iron Solution</i>		
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	4.98	1 mL
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		1 mL
<i>Boron Solution</i>		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11.42	
<i>Trace Metals Solution</i>		
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8.82	1 mL
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1.44	
MoO <sub>3</sub>	0.71	
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	1.57	
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.49	

Pour la culture il faut additionner du glucose à hauteur de 0,25 %.

### 3.2.4- Mesure des taux de croissance

Le taux de croissance des algues a été mesuré par le calcul de densité optique au spectrophotomètre (BEKMAN 500), à une longueur d'onde de 680 nm pendant 4 semaines, à 7 jours d'intervalle (CHANG et YANG, 2003). Les cultures ont été conduites dans des conditions strictes de stérilisation.

Le milieu de culture Bold's Basal liquide stérilisé est inoculé à hauteur d'un volume de 20 % V/ V<sub>total</sub> (V<sub>total</sub> = 250 ml) à partir des cultures des Chlorelles réalisées précédemment.

Les cultures alors sont soumises aux conditions suivantes :

- Photopériode : jour long (16h de lumière et 8h d'obscurité).
- Température : la température diurne est de  $(25 \pm 2)$  °C et nocturne de  $(23 \pm 2)$  °C durant la nuit.
- Une agitation de 137 tr/ min.
- Un pH de 7.



## Résultats et discussion

## **4- Résultats et discussion**

### **4.1- Prolifération et isolement des microalgues**

En raison de la pureté des eaux prélevées, la diversité microflorale est plus ou moins réduite. Il est généralement admis que, les conditions physico chimiques du milieu ont une influence directe sur la diversité et la répartition de la microflore aquatique (CHADER, 2009).

Dans notre cas, les concentrations élevées en ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ) favorisent la croissance de quelques espèces microalgales cosmopolites. Les taxons majoritaires identifiés, dans le site d'étude, sont les Chlorophycées, très peu de Cyanophycées, et pratiquement pas de Diatomées, leur répartition est plus ou moins similaire quelque soit la zone de prélèvement (GHOBINI, communication personnelle).

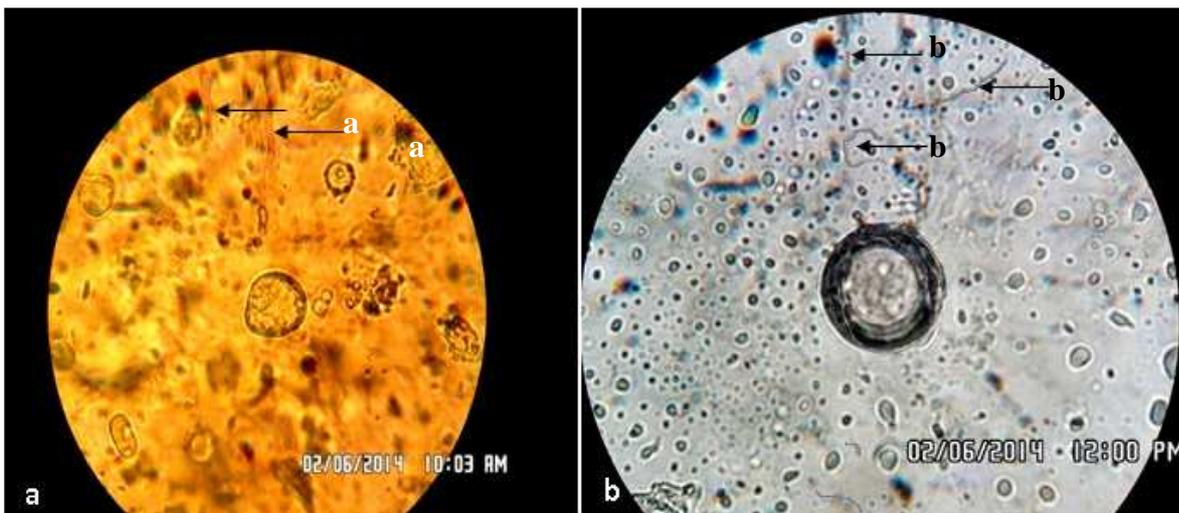
A partir des échantillons d'eau, l'utilisation du milieu de culture solide BG11, a permis des isollements plus ou moins similaires en terme de taux de prolifération sur toutes les zones de prélèvement (fig. 26). Ainsi, après la période d'incubation, plusieurs colonies apparaissent d'aspect et de consistance différents.

Toutefois, il est important de rappeler que l'obtention de la culture microalgale sur ce milieu a nécessité une incubation plus ou moins longue dans la chambre de culture (6 à 21 jours). Ceci était indispensable, car les premiers essais ont échoué du fait du séchage rapide des cultures. La chambre de culture thermostatée assurait toutes les conditions favorables à la croissance des microalgues (28 °C de température, et une photopériode de jour long (16 h de lumière/ 8 h d'obscurité).



**Figure 26 :** Prolifération des microalgues dans le milieu de culture solide (BG 11) à partir de différents prélèvements.

En plus des microalgues, l'observation des cultures d'isolement rend compte de la prolifération des contaminations bactériennes et fongiques (fig. 27) écartées par des repiquages répétitifs avec des milieux de culture neufs sous une hotte à flux laminaire horizontale.

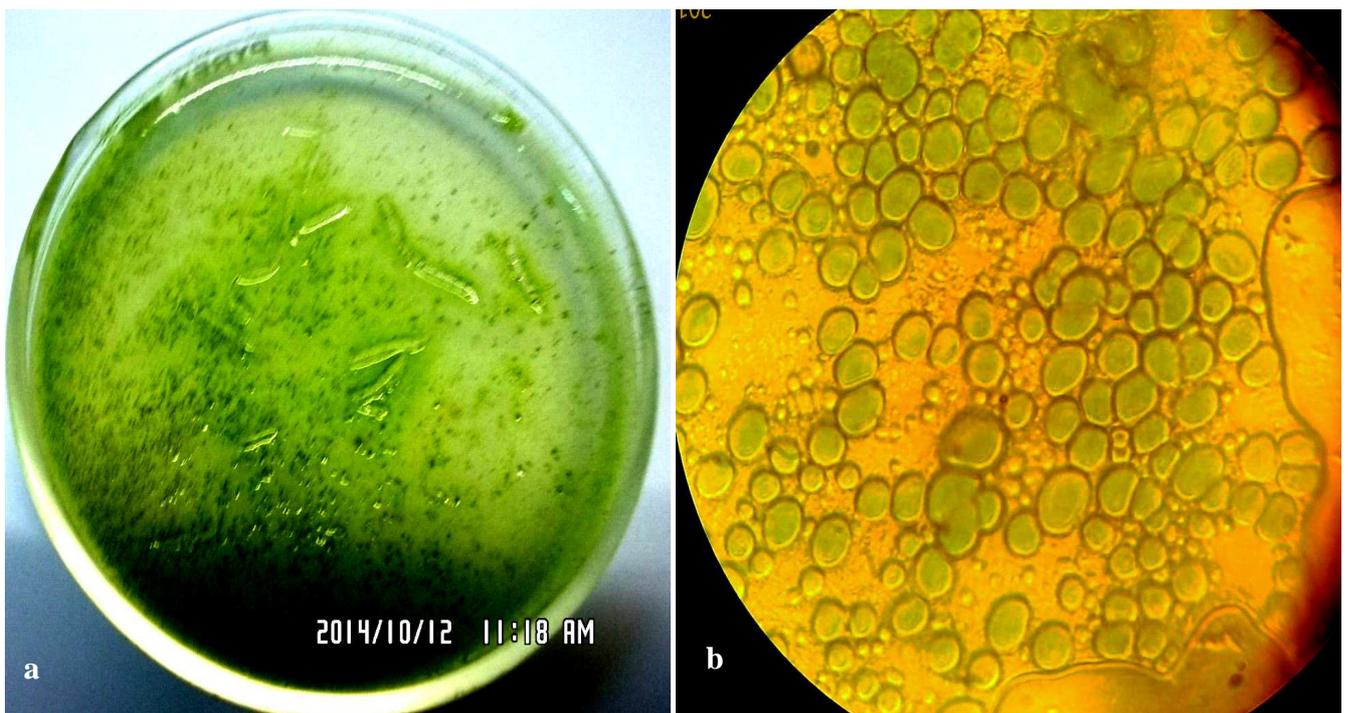


**Figure 27 :** Aspect des microalgues pendant la phase d'isolement ; observées au microscope photonique, avec apparitions des contaminations, grossissement (Gx40 « A » et Gx10 « B ») (Les flèches « a » indiquent les hyphes mycéliens, et « b » indiquent des contaminations bactériennes).

En ce qui concerne nos échantillons et en se basant sur les clés de détermination utilisées, on trouvera principalement des chlorophycophytes, ce qui est sans conteste, le phylum le plus important, caractérisé par ses pigments : chlorophylles a et b,  $\beta$  carotène et oxycarotènes ainsi que par le produit de réserve élaboré, représenté par le pyrénoïde intraplastidial entouré d'amidon (CHADER, 2009). Au cours de notre étude, nous avons pu isoler dans les différentes zones de prélèvement, une souche de microalgues appartenant à la classe des Chlorophycées (fig. 28a).

Les cellules sont unicellulaires, sphériques, certaines plus ou moins allongées, d'un diamètre variant entre 3 et 6  $\mu\text{m}$ , avec absence totale des flagelles. Chaque cellule est constituée d'une paroi fine qui entoure un plaste en forme de coupe généralement pariétal, constitué de pigments chlorophylliens.

La reproduction est exclusivement asexuée avec formation d'autospores à l'intérieur de la cellule par division en deux, quatre ou plus (fig. 28b).



**Figure 28** : Souche de microalgue appartenant à la famille des Chlorelles (a : observation de la culture d'isolement ; b : observation de *Chlorella sp* sous microscope optique G x 100).

Ainsi, la souche isolée est alors purifiée, cette opération de purification consiste à prélever à part toutes les colonies vertes qui apparaissent sur la surface des boîtes de pétri à

l'aide d'une anse, ensuite les repiquer de nouveau en stries sur le même milieu qui a servi à son isolement, dans notre cas le milieu solide BG 11 (fig. 29).

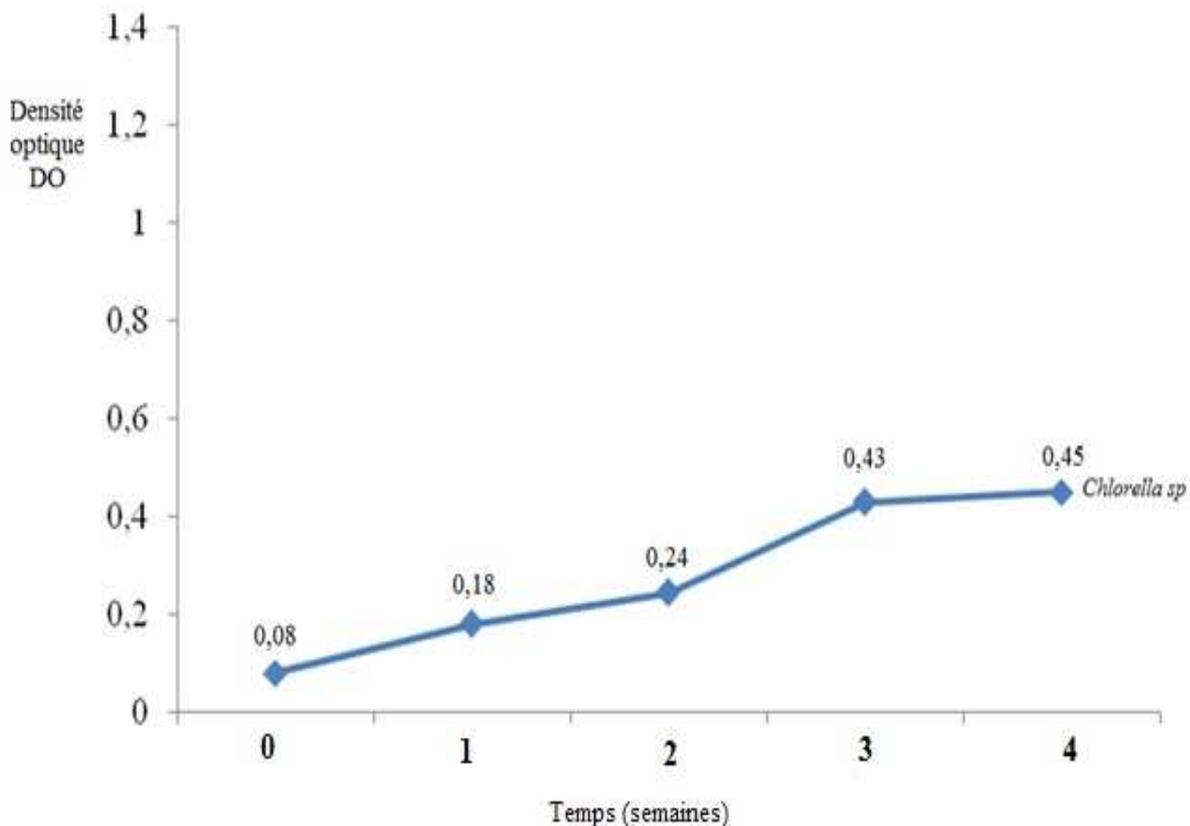


**Figure 29:** Technique de repiquage en stries et le résultat obtenu.  
( a : technique, b : résultat )

#### 4.2- Essais de production de biomasse par la souche isolée

Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressées principalement à la production de biomasse algale à partir d'une microalgue verte *Chlorella sp.* en culture discontinue sur le milieu liquide Bold's Basal (BB).

Ainsi, le suivi des cultures pendant 30 jours a permis de déterminer le taux de croissance maximum de *Chlorella sp.* sur le milieu de culture (BB). Ce dernier est exponentiel durant toute la durée de l'expérimentation (fig. 30). Ce qui corrobore les résultats obtenus par plusieurs auteurs notamment NASHIMA et PALANISAMY (2012) sur plusieurs espèces du genre *Chlorella* et *Oscillatoria*, (car le maximum de croissance atteint une DO de 0,84 pour *Chlorella* et 0,47 pour *Oscillatoria*).



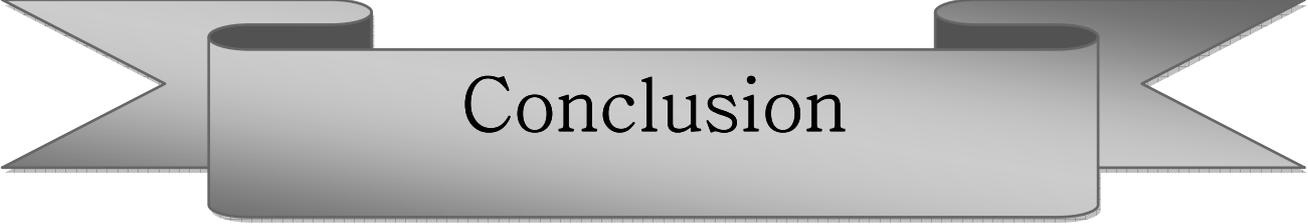
**Figure 30:** Cinétique de croissance de *Chlorella sp.* en milieu Bold's Basal (BB).

Par ailleurs, la production de biomasse évolue progressivement au cours du temps, pour atteindre une DO d'environ 0,45 au bout de 4 semaines de culture. Toutefois, la teneur finale obtenue reste moyennement faible, par rapport à celle rapportée par ces mêmes auteurs, dans ce cas, les milieux de culture ont été améliorés avec l'addition d'une source d'azote,

notamment du phosphate d'ammonium  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ , auquel sont associées des vitamines (B12 et B6).

Nous notons aussi que le  $\text{pH} = 7$  du milieu n'a pas inhibé le fonctionnement de la souche isolée. De même, aucune phase de latence n'a été observée dans la production de biomasse; ce qui implique que le temps de réactivité de notre souche sur le milieu Bold's Basal (BB) est très réduit. Ceci peut être attribué au passage par la phase de croissance (3 semaines de culture en milieu liquide BB) qui avait pour objectif d'adapter la chlorelle isolée pour qu'elle puisse réduire son temps de réactivité dans la phase de production. De plus, la présence de teneurs en sucre dans le milieu (BB) peut avoir un effet positif sur le temps de latence, en effet, nous supposons que notre souche serait soustraite à cette période latence par l'utilisation du sucre présent dans le milieu liquide pour ses premières phases de développement.

Ceci dénote que la souche étudiée s'organise en phototrophie sur le milieu (BG 11) et en combinant les deux modes phototrophique et hétérotrophique sur le milieu (BB) du moins au début de la culture ; ce qui est le cas de la majorité des chlorelles : en effet, ces dernières peuvent être phototrophes et/ou mixotrophes suivant les conditions de culture (GHOBRINI communication personnelle).



Conclusion

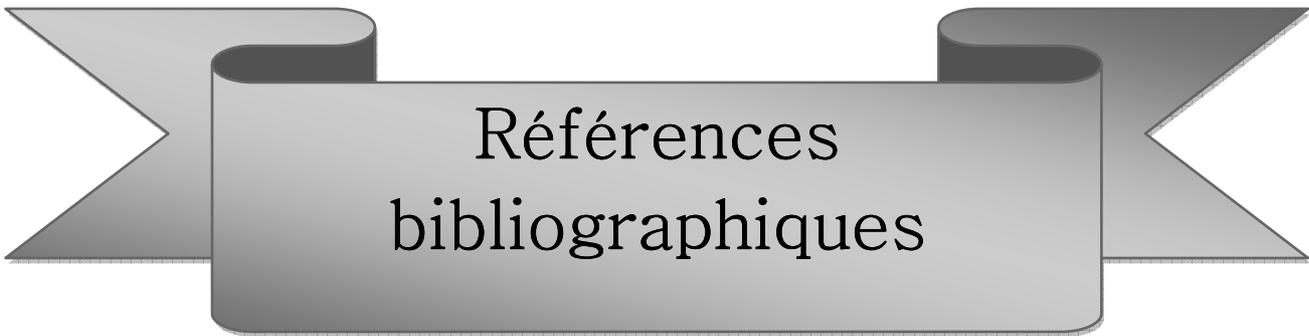
Les microalgues sont actuellement envisagées comme des organismes capables de produire de l'énergie ainsi que des substances à très haute valeur pour l'industrie. D'autre part, les microalgues sont considérées comme un moyen de réduction des émissions de gaz à effet de serre.

Toutefois, il est difficile aujourd'hui d'attribuer une part de marché à chaque secteur d'application potentiel des microalgues, en particulier parce que tous ces secteurs en devenir sont dans l'attente d'une production de biomasse stable, de qualité et à moindre coût, non atteinte à ce jour.

Dans notre étude, nous avons répartis et isolé des microalgues issues du cours d'eau d'Assif El Hammam localisé dans le parc national du Djurdjura sur un milieu de culture solide BG 11. La méthode adoptée pour l'isolement et la purification de la souche *Chlorella* a permis d'obtenir des souches de chlorelles valorisables pour la production de biomasse.

L'impact des paramètres de culture a permis d'optimiser les conditions de culture de la chlorelle pour une production sélective de biomasse. Ainsi, l'analyse du taux de croissance maximum de *Chlorella sp.* sur le milieu de culture Blod's Basal (BB), rendue possible grâce à une technique spectrophotométrique, révèle une croissance exponentielle de la culture, avec absence de période de latence qui fait suite au passage de la culture par une phase de croissance sur le même milieu de culture (Blod's Basal) et à la présence d'une source de carbone assimilable par les microalgues isolées. Dans ce dernier cas, la souche de *Chlorella* isolée utiliserait un mode de nutrition hétérotrophe en combinaison avec le mode phototrophe (du moins au début de l'expérience), ce cas de figure concerne la majorité des chlorelles qui peuvent être à la fois phototrophe et/ ou mixotrophe.

Pour parfaire notre travail, il serait plus judicieux de faire varier le pH des cultures pour en déterminer l'optimum de la *Chlorella* isolée, mais aussi d'analyser les sucres totaux au niveau du milieu de culture pour confirmer notre supposition quand à une éventuelle utilisation du saccharose par la souche de *Chlorella* isolée.



Références  
bibliographiques

- **ABDEREZZAK N., 2011.** Optimisation de l'utilisation du biogaz des méthaniseurs. Mémoire de magister, Ecole doctorale en énergétique et développement durable. FSI, Université de Boumerdes, 77 p.
- **AGREN G. I., 2004.** The C:N:P stoichiometry of autotrophs — theory and observations. *Ecology Letters*, 7, pp: 185-191.
- **ALCAINE A. A., 2010.** Biodiesel from microalgae. Final degree project. Royal School of Technology Kungliga Tekniska Högskolan, *Stockholm, Sweden*.
- **AMRANI M., 2007.** Simulation du procédé de fabrication du biodiesel a partir des graisses jaunes. *Facta universitatis, Séries: Physics, Chemistry and Technology*, 5 (1) : 61 - 67
- **ANDERSEN D. M., 1994.** Eaux colorées et phytoplancton toxique. *Pour Science*, 204, 68 – 76.
- **ANEX P-F., 2012.** Les Algues comme biocarburant. Mémoire de master 2 Biologie Gestion, université de Rennes 1, 32 p.
- **ARICO, B, V. SCARLATO D.M, MONACK S, FALKOW and RAPPOULI R. 1991.** Structural and genetic analysis of the *Chlorella* species. *Mol. Microbiol.* 5: 2481-2491.
- **BALLARE C. L., SANCHEZ R. A., SCOPEL A. L., CASAL J. J., et GHERSA C. M., 1987.** Early detection of neighbour plants by phytochrome perception of spectral changes in reflected sunlight. *Plant, Cell and Environment.* 10, pp: 551-557.
- **BECERRA-CELIS, G. P., 2009.** Proposition de stratégies de commande pour la culture de microalgues dans un photobioréacteur continu. Thèse de Doctorat, Ecole supérieure d'électricité, Gif-sur-Yvette (France).
- **BECKER E. W., 2003.** Microalgae in Human and Animal Nutrition. In A. Richmond (Ed.), *Handbook of Microalgal Culture*, Blackwell Publishing Ltd. Pp: 312–351.
- **BEER et al., (2009).** Structure morphologique de *Chlorella*
- **BELKOURA M., et DAUTA A., 1992.** Interaction lumière – température et influence de la photopériode sur le taux de croissance de *Chlorella sorokiniana* Shirhira & Krauss. *Annl. Limnol.*, 28 (2): 101 – 107.
- **BHOLA, V., DESIKAN, R., SANTOSH, S. K., SUBBURAMU, K., SANNIYASI, E., BUX, F., 2001.** Effects of parameters affecting biomass yield and thermal behaviour of *Chlorella vulgaris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 111 (3), pp. 377–382.
- **BOROWITZKA, M.A. 1998.** Vitamins and fine chemicals form micro-algae. In: **BOROWITZKA, M.A., BOROWITZKA, L.J.** (Eds.), *Micro Algal Biotechnology*. Cambridge University Press, pp. 153-196.
- **BUITENHUIS E.T., 2003.** Contributions to accelerating atmospheric CO2 growth from economic activity, carbon intensity, and efficiency of natural sinks. *PNAS* ; 104 (47) : 18866-18870 ; 20 novembre 2007

- **CADORET J. et BERNARD O., 2008.** La production de biocarburant lipidique avec des microalgues : promesses et défis. *Journal de la société de biologie*, vol 202 (3) : 201 – 211.
- **CANTIN I., 2010.** La production de biodiesel à partir des microalgues ayant un métabolisme hétérotrophe. Maîtrise en environnement, Université de Sherbrooke, Québec, Canada, pp. 1 – 82.
- **CHADER S., 2009.** Etude du mécanisme de production biologique de l'hydrogène par les microalgues. Thèse de doctorat de biologie, USTHB, Alger, 122 p.
- **CHAIB H., 2011.** Etudes et conception d'une bioraffinerie pour la production des biocarburants de seconde génération. Mémoire de magister, FSTSM, Université Kasdi Merbah Ouargla, 77 p.
- **CHEFTEL J. C., BESANCON P., 1977.** Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments, volume 2, *Eds Tec & Doc*, Paris 420 p.
- **CHEN M., TANGA H., HOLLAND T. C. et SALLEY S. O., 2011.** Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology*, Volume 102, Issue 2, pp. 1649-1955.
- **CHISTI Y., 2007.** Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, Vol. 25 (3): 294 – 306.
- COURANC, 2012
- **DABBADIE L., 1992.** Cultures intensives de microalgues sur lisier de porc: performances, contraintes, utilisation des biomasses. Mémoire d'Ingénieur Agronome de l'école nationale supérieure agronomique de Montpellier, France, 125p.
- **DESCHENES, F., 2009.** Utilisation des microalgues comme source d'énergie durable. Essai de maîtrise en environnement, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, 111 p.
- **FILALI, 2012.** Estimation et commande robustes de culture de microalgues pour la valorisation biologique du CO<sub>2</sub>. Ecole supérieur d'Électricité / Supelec, Paris, 224 p.
- **GAFFRON H. et RUBIN J., 1942.** Fermentative and photochemical Production of hydrogen in algae. *J. Gen. Physiol.*, 26: 219 – 240.
- **GHIRARDI M. L., TOGASAKI R. K. et SEIBERT M., 1997.** Oxygen sensitivity of algal H<sub>2</sub>-production. *Appl. Biochem. Biotech.* 63: 141 – 151.
- **GHOBRINI D. AIBOUD K. et YAKOUB-BOUGDAL S., 2014.** Effect of red and far-red light on biomass productivity on *Chlorella vulgaris* cultivated on photobioreactor. *BioTech 2014 and Czech-Swiss symposium*, 11 – 14 Jun 2014, Praha Czech Republic.
- **GONDET L., 2009.** Biodiesel / Bioéthanol : Quel avenir pour les biocarburants ?. Recherche et Analyse de Données Scientifiques, Université de Strasbourg, 27 p.

- **GREEN B. R. et DURNFORD D. G., 1996.** The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic Photosynthesis. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 47: 685 – 714.
- **HAMAD B., 2009.** Transestérification des huiles végétales par l'éthanol en conditions douces par catalyses hétérogènes acide et basique. Thèse de doctorat, l'université Claude Bernard - Lyon 1, 197 p.
- **HARRIS G. P., 1988.** Phytoplankton ecology. *Chapman & Hall*, New York. 254p.
- **HAPPE T. et KAMINSKI A., 2002.** Differential regulation of the [Fe]-hydrogenase during anaerobic adaptation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Biochem.*, 269: 1022–1032
- **JENCK J., LEPINE O., LEGRAND J., DRENO P., GRIZEAU D. et DUPRE C., 2011.** 'Valorisation Industrielle des Micro Algues Photosynthétiques', Ed., Technique de l'ingénieur, 13 p.
- **KESSLER. & HUSS S.A.R. 1992.** Comparative physiology and Biochemistry and taxonomic assignment of the *Chlorella* (Chlorophyceae) strains of the culture collection of the University of Texas at Austin. *Journal of Phycology* 28: 550-553.
- **KHALDI H. et ZEGGAOUI Z., 2014.** Détermination de quelques espèces de microalgues. In Algues. (ANRDE ILTIS)Pdf. PP. 10-44.
- **KRINITZ et al., 2004.** Taxonomie de la *Chlorella*. In La *Chlorella*, c'est quoi ? Pdf. P56.
- **KUMAR A., ERGAS S., YUAN X., SAHU A., ZHANG Q., DEWULF J., MALCATA F. X. et VAN LANGENHOVE H., 2010.** Enhanced  $CO_2$  fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. *Trends in Biotechnology*, Volume 28, Issue 7, pp. 371-380.
- **LIVANSKY, K., 1990.** Novel outdoor thin-layer high density microalgal culture system: Productivity and operational parameters. *Algol. Stud. (Trebou)* 76: 129-147.
- **LU C., TORZILLA G., VONSHAK A., 1999.** Kinetic response of photosystem II photochemistry in the cyanobacterium *Spirulina plantensis* to high salinity is characterized by two distinct phases. *Australian Journal of Plant Physiology*. 26, pp. 283-292.
- **MAZLIAK P., 1998.** Physiologie végétale. Croissance et développement. Editions Hermann, Tome 2, Paris, 575 p.
- **MAIONE T. E. et GIBBS M., 1986.** Association of the chloroplastic respiratory and photosynthetic electron transport chains of *C. reinhardtii* with photoreduction and the oxyhydrogen reaction. *Plant Physiol* 80: 364 – 368.
- **MALONE T. C., 1982.** Phytoplankton photosynthesis and carbon-specific growth: light-saturated rates in a nutrient-rich environment. *Limnology and Oceanography*, 27: 226 – 235.
- **MELIS A., ZHANG L., FORESTIER M., GHIRARDI M. L. et SEIBERT M., 2000.** Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation

- of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*, 122: 127 – 136.
- **MELIS A. et HAPPE T., 2001.** Hydrogen production: green algae as a source of energy. *Plant Physiology* 127: 740 – 748.
  - **MERABET S., 2014.** Inventaire des arthropodes dans trois stations de la forêt de Darna (Djurdjura).P7
  - **MIGNOLET E., 2012.** Conception et réalisation d'un photobioréacteur adapté à l'étude de la production d'hydrogène chez les micro-algues. Thèse de Doctorat de l'université de Liège, Belgique, 197 p.
  - **MOLETTA R., 2008.** La méthanisation. *Coord. Éditions Tec & Doc – Lavoisier*, Paris, 532 p.
  - **NABORS, L. O. B. (2004).** Alternative sweeteners. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 15(4), 39-41.
  - **NASHIMA K. et PALANISAMY A., 2012.** Biodiesel Production by *Chlorella sp.* and *Oscillatoria sp.* *IJPI'S Journal of Biotechnology and Biotherapeutics*, Vol 2 - 10.
  - **NIGAM P. S. et SINGH A., 2011.** Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, Vol. 37 (1): 52 – 68.
  - **OUBELLIL D., 2010.** Sélection de l'habitat et écologie alimentaire du chacal doré *Canis aureus Algerensis* dans le parc national de Djurdjura. P4
  - **OLIVEIER B., 2007.** Vers une filière algue-carburant en France. PP 68-71
  - **OLIVO E., 2007.** Conception et étude d'un photobioréacteur pour la production en continu de microalgues en écloséries aquacoles. Thèse de Doctorat, Université de Nantes, France, 125 p.
  - **PALLUET E. et PINEAU P. O., 2012.** Les biocarburants : matières premières, transformation et produits. *Les Notes thématiques GRIDD-HEC*, N° 1, 41 p.
  - **PERSON J., 2010.** Livre turquoise – Algues, filières du futur. *Édition Adebitech*, Romainville, 163 p.
  - **PILLONETTO P.-F., 2013.** Apport d'énergie renouvelable à un bâtiment urbain par l'implantation d'un système de photobioréacteurs. *Revue Scientifique des Ingénieurs Industriels*, n° 27 : 65 – 83.
  - **PIERRE G., 2010.** Caractérisation biochimique d'exo-polymères d'origine algale du bassin de Marennes-Oléron et étude des propriétés physico-chimiques de surface de micro-organismes impliquées dans leur adhésion. Thèse de doctorat, université la Rochelle, 192 p.
  - **POITRAT E., 2009.** Biocarburants. *Techniques de l'Ingénieur*, BE 8550.
  - **PRUVOST J., CORNET J. F., BORGNE F. et JENCK J., 2011.** Production industrielle de microalgues et cyanobactéries, *Techniques de l'Ingénieur*, rubrique Innovations (in200) : PP1 – 17.

- **RICHMOND A., 1999.** Physiological principles and modes of cultivation in mass production of photoautotrophic microalgae. In: Chemical from microalgae. (Cohen, Z. eds). Taylor and Francis, Philadelphia, pp. 353-386.
- **RENGEL A., 2010.** Conception et analyses énergétique et environnementale d'un bioréacteur à microalgues pour la production d'énergie. Thèse de doctorat, Mines ParisTec, 183 p.
- **RICHMOND, A. 2004.** Principles for attaining maximal microalgal productivity in Photobioreactors: an overview. *Hydrobiologia* 512: 33 – 37.
- **ROCHAIX J. D., 2011.** Assembly, function, and dynamics of the photosynthetic machinery in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant physiology* 127 (4): 1394-1398.
- **SADI M., 2012.** Les microalgues: un défi prometteur pour des biocarburants propres. *Revue des Energies Renouvelables SIENR'12 Ghardaïa (2012)* : 195 – 202.
- **SHARMA N. K. et RAI A. K., 2011.** Biodiversity and biogeography of microalgae: progress and pitfalls. *Environmental Reviews*, 19 (1) : 1 – 15.
- **SIALVE B., STEYER J-P., 2013.** Les microalgues, promesses et défis. *Innovations Agronomiques*, 26 : 25-39.
- **SMITH H., 2000.** Phytochromes and light signal perception by plants an emerging synthesis. *Nature* 407: 585-691.
- **SOBCZUK T. M., CAMACHO F. G., RUBIO F. C., FERNANDEZ F. G. A., GRIMA E. M., 2000.** “Carbon Dioxide Uptake Efficiency by Outdoor Microalgal Cultures in Tubular Airlift Photobioreactors,” *Biotechnology and Bioengineering*, 67 (4): 465 – 475.
- **SUBHADRA B. et EDWARDS M, 2010.** An integrated renewable energy park approach for algal biofuel production in United States. *Energy Policy* 38, 4897.
- **TOGNANG MBENDOU E. P., 2013.** Production du bioéthanol à partir des résidus de bois : cas du Moabi. Mémoire de Licence de Physique, ENS de Yaoundé, Cameroun, 64 p.
- **WANG, B., LI, Y., WU, N., LAN, C.Q., 2008.** *C*<sub>02</sub> bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79, pp. 707–718.
- **WEN Z. et JOHNSON M. B., 2009.** Microalgae as a feedstock for biofuel production, Virginia Cooperative Extension Publication, pp. 442 – 886.
- **YUN Y. S. et Park J., 1997.** Development of gas recycling photobioreactor system for microalgal carbon dioxide fixation. *Korean Journal of Chemical Engineering* 14 (4): 297 – 300.
- **ZHANG K., KURANO N. et MIYACHI S., 1999.** Outdoor culture of Cyanobacterium with a vertical flat-plate photobioreactor: effects on productivity of the reactor orientation, distance setting between the plates, and culture temperature. *Applied Microbial and Biotechnology*, 52, pp. 781 – 786.

**Autres références**

- (ANONYME<sub>1</sub>, 2004) [http : //WWW.La chlorelle \(ou \*Chlorella\*\), aliment miracle ou fabulations .html](http://WWW.La%20chlorelle%20(ou%20Chlorella),%20aliment%20miracle%20ou%20fabulations.html).
- (ANONYME<sub>2</sub>, 2006). [Http ://WWW.Fabrication du biodiesel/Biocarburant, algocarburant, microalgue, éthanol, biodiesel.htm](Http://WWW.Fabrication%20du%20biodiesel/Biocarburant,%20algotcarburant,%20microalgue,%20éthanol,%20biodiesel.htm).
- (ANONYME<sub>3</sub>, 2011) <http://www.techni-process.com>
- (ANONYME<sub>4</sub>, 2011) <http://www.wordpress.com>
- (ANONYME<sub>5</sub>, 2014) [.http://www.econologie.com/forums/le-vehicule-a-hydrogene-vu-par-total.html](http://www.econologie.com/forums/le-vehicule-a-hydrogene-vu-par-total.html)
- (ANONYME<sub>6</sub>, 2014). <http://micro-algues-tpe.eklablog.com>
- (ANONYME<sub>7</sub>, 2014) <http://www.ifpenergiesnouvelles.fr/>
- (ANONYME<sub>8</sub>, 2014) <http://www.fr.biofuels.arc.ab.ca/Biocombustibles/Justifications/.ksi>
- (ANONYME<sub>9</sub>,2014) <http://www.ec.gc.ca /CAOL/transport/publications/biodiesel/.htm>
- (ANONYME<sub>10</sub>,2014) <http://www .sciencedirecte.com>
- (ANONYME<sub>11</sub>, 2014) <http://www.daneprairie.com>.
- (ANONYME<sub>12</sub>, 2014) [http://www.sofiproteol.com/media/Demarche\\_progres Diester.pdf](http://www.sofiproteol.com/media/Demarche_progres_Diester.pdf)
- (ANONYME<sub>13</sub>,2014).[http://www.prolea.com/fileadmin/extranet/ /thematique/filiere/actualites/communiqués 2009/DP\\_090221\\_SIA\\_2009 Diester.pdf](http://www.prolea.com/fileadmin/extranet/ /thematique/filiere/actualites/communiqués_2009/DP_090221_SIA_2009_Diester.pdf)
- (ANONYME<sub>14</sub>, 2014) [http://www.Hotte à flux laminaire — Wikipédia.htm](http://www.Hotte%20à%20flux%20laminaire%20—%20Wikipédia.htm)

## **Résumé**

Les microalgues semblent être une solution intéressante pour la production des biocarburants. Ces végétaux microscopiques ont la possibilité d'être cultivés de différentes manières afin d'extraire par la suite des substances de très haute valeur pour l'industrie.

Pour produire de la biomasse algale on utilise une méthode basée sur l'isolement puis la purification des souches par repiquage répété sur boîtes de pétri contenant du milieu solide BG11 suivi de leur culture sur un autre milieu Bold's Basal (BB). L'analyse du taux de croissance maximum de *Chlorella sp.* sur le milieu de culture (BB), est rendue possible grâce à une technique spectrophotométrique.

**Mot clés :** Microalgues, *Chlorella sp.*, biomasse, production.

## **Abstract**

Microalgae appear to be an interesting solution for the production of biofuels. These microscopic plants have the ability to be grown in different ways to extract the following substances of very high value to the industry.

To produce algal biomass method based on the isolation and purification of strains by repeated subculture on petri dishes containing solid medium BG11 follow their culture on another medium Bold's Basal (BB) is used. Analysis of the maximum growth rate of *Chlorella sp.* On the culture medium (BB) is made possible by a spectrophotometric technique.

**Keywords:** Microalgae, *Chlorella sp.*, biomass, production.