



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : BIOCHIMIE/BIOLOGIE CELLULAIRE et MOLECULAIRE

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master 2

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Biochimie /Analyse Protéomique et Santé*

Intitulé :

Modification des fractions protéiques, enzymatiques et lipidiques de la souche *Cyclotella sp.* durant le processus de la caroténogénèse.

Présenté par :

- KOUTEN Meriem
- BOUAOUN Kenza

Soutenu le : Juin 2015

Jury d'évaluation :

Président : MR. *KHELIFI DOUADI*

Prof. Université Frères Mentouri Constantine

Rapporteur: MR. GRAMA BORHANE S.

MCB. Université L'Arbi Ben M'Hidi Oum El Bouaghie

Examinatrice : Melle. BELLIL INES

MCB. Université Frères Mentouri Constantine

*Année universitaire
2014 - 2015*

Remerciements

Nous remercions Dieu le tout puissant qui nous a donné Courage, patience et force jusqu'à la fin de la Réalisation de ce mémoire de master.

Nous tenons à exprimer nos sincères gratitudee à notre encadreur de ce mémoire :
Monsieur **GRAMA BORHANE SAMIR** docteur à l'Université
L'Arbi Ben M'Hidi Oum El Bouaghie d'avoir accepté de diriger ce travail, pour son aide durant ces mois, pour sa disponibilité, pour la confiance qu'il nous a accordé, ses nombreux encouragements et ses précieux conseils.

Nous tenons à remercier Monsieur **KHELIFI DOUADI** : professeur à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'université des Frères Mentouri de Constantine pour nous avoir permis l'accès au laboratoire de biochimie génétiques et biotechnologies végétales en vue de la réalisation d'une partie de notre travail et pour nous avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury.

Nous exprimons nos reconnaissances également à Mademoiselle **BELLIL INES** : doctorante à la Faculté des sciences de la Nature et de la Vie à l'Université des Frères Mentouride Constantine pour avoir accepté de lire et juger ce mémoire.

Nous tenons à remercier Madame **MECHAKRA AICHA** : professeur à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'Université des Frères Mentouri de Constantine pour nous avoir permis l'accès au laboratoire de biologie et environnement en vue de la réalisation d'une partie de notre travail.

Nos vifs remerciements à Mademoiselle **BEN HAMDI ASMA** pour son aide scientifique.

Nos gratitudee à l'ensemble de l'équipe de notre laboratoire pour la bonne ambiance qu'il nous a apportée et nos vifs remerciements vont à M^{elle} **IMAN** et **ASMA** pour leur aide scientifique.

Nous remercions nos parents, nos frères, pour l'amour, l'aide et le soutien qu'ils nous ont toujours apporté dans les moments difficiles.

Nos remerciements à tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin pour la réalisation de notre travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à ceux qui m'ont aidé à tout surmonter,

M'ont soutenue et m'ont encouragée:

Mes merveilleux papa *Abdelhakke* et maman *Khelifi Zeineb*,

Mes adorables frères et ma cousine *Amel*,

Mes très chères amies *Kahina*, *Asma* et *Meriem* vous êtes les meilleurs amies
qui existent.

A toute ma famille

Bouaoun kenza

Dédicace

Je dédie ce travail à ma très chère maman et mon très cher papa, pour leur patience, leur amour et leur confiance en moi.

A mes chères sœurs *Cheimaet Oumeima*

A mon cher frère *Mohamed*

A mes chères tantes *Fatima* et *Sabah* pour leurs prières, que Dieu vous garde pour nous

Mes très chères amies *Kahina, Asmaet Kenza.*

A toute ma famille

Kouiten Meriem

Résumés

Les microalgues, sont des organismes microscopiques qui possèdent un grand potentiel pour la production de métabolites secondaires de grande valeur, notamment les caroténoïdes secondaires, qui se caractérisent par une grande activité antioxydante. Dans notre étude, une mise au point d'un bioprocédé qui a été utilisé pour la culture de la souche de *Cyclotella* sp. dans des conditions contrôlées de culture. Le processus de la caroténogénèse a été induit sous une combinaison de stress ; un stress nutritionnel (carence de nitrate), un stress lumineux (l'intensité lumineuse a été doublée) et un stress salin représenté par l'ajout du 7.5 g.L⁻¹ NaCl. La combinaison de stress utilisée dans notre étude a eu une grande influence sur l'induction et également sur l'état morphologique et physiologique des cultures, avec une augmentation de la teneur en lipide, le poids sec et la teneur des caroténoïdes secondaires. Ces changements ont été également accompagnés par des changements de la teneur des protéines et des enzymes, spécifiquement les enzymes antioxydants.

Mots clés : *Cyclotella*. sp, caroténoïdes, protéines, enzymes, bioprocédé

Microalgae are microscopic organisms that have large potential for the production of secondary metabolites of great value, including secondary carotenoids, which is characterized by high antioxidant activity. In our study, the development of a bioprocess that was used for the cultivation of the strain of *Cyclotella sp.* in controlled condition culture. The process of carotenogenesis was induced with a combination of stress; nutritional stress (nitrate deficiency), a light stress (the light intensity was doubled) and salt stress represented by the addition of 7.5 g.L⁻¹ NaCl. The combination of stress used in our study had a big influence on the induction and also on the morphological and physiological state of cultures, with an increase in the lipid content, dry weight and content of secondary carotenoids. These changes were also accompanied by changes in the content of proteins and enzymes, specifically enzymes antioxidants.

Keywords: *Cyclotella sp.*, carotenoids, proteins, enzymes, bioprocess.

الطحالب الدقيقة هي كائنات حية مجهرية و التي تمتلك امكانات كبيرة لانتاج المركبات الثانوية ذات القيمة العالية . بما في ذلك الكاروتينات الثانوية التي تتميز بنشاط كبير مضاد للاكسدة. في دراستنا هذه، تم تطوير العمليات الحيوية التي من نوع *Cyclotella sp.*، في ظل مراقبة ظروف الزراعة. عملية Caroténogénese إستخدامها لزراعة سلالة التي نجمت تحت مزيج من الظروف الغير ملائمة، و المتمثلة في الإجهاد الغذائي (نقص النترات)، الإجهاد الضوئي (مضاعفة شدة الضوء) بالإضافة الى الإجهاد الملحي عن طريق إضافة كمية زائدة من كلوريد الصوديوم هذه المجموعة من الإجهادات المستعملة في دراستنا لها تأثير كبير على الإستقرء و ايضا على الحالة المورفولوجية و الفيزيولوجية للخلايا المزروعة مع زيادة في المحتوى الكمي للدهون، الوزن الجاف و ايضا المحتوى الكمي للكاروتينات الثانوية، هذه التغيرات رافقتها تغيرات في المحتوى الكمي للبروتينات و الإنزيمات خاصة الإنزيمات المضادة للأكسدة.

الكلمات المفتاحية : الكاروتينات، البروتينات، الإنزيمات، العمليات الحيوية، *Cyclotella sp.*

Sommaire

Sommaire

Liste des abréviations

Listes des Figures et des Tableaux

Introduction	01
1. Les microalgues	03
2. Mode de vie et reproduction des microalgues	04
3. Les utilisations des micro-algues	05
4. Effets des différents types de stress sur les cellules algales	07
• 4.1. Le stress oxydatif	08
• 4.2. L'intensité lumineuse	08
• 4.3. La salinité	10
• 4.4. Le pH	10
• 4.5 Température	11
• 4.5. La carence d'azote	11
5. La caroténogénèse et la production des caroténoïdes par les microalgues	12
2. Matériel et Méthodes	15
• 2.1. Souche de microalgue étudiée	15
• 2.2. Milieux de culture et croissance cellulaire (phase verte)	15
• 2.3. Cultures en phase de caroténogénèse	15
3. Analyses biochimiques des extraits produits	17
• 3.1. Analyse des lipides	17
• 3.2. Analyse des nitrates	18
• 3.3. Densité des cultures cellulaires	18
• 3.4. Dosage des protéines et des enzymes	19
• 3.5. Dosage de Malondialdehyde.....	19
• 3.6. Détermination des profils enzymatiques par MLEE	19
• 3.7. Détermination des profils protéiques par SDS-PAGE	19

3. Résultats	20
Analyse des cultures.....	20
• 3.1. Production de biomasse et caractérisation des cellules.....	20
• 3.2. Production de pigments.....	22
• 3.3. Production des Lipides	23
• 3.4. La teneur en protéine et des enzymes.....	24
• 3.5. La concentration des sous-produits lipidiques	24
• 3.6. Profil protéique (SDS-Page).....	25
4. Discussion	27
Conclusion	33
Références bibliographiques	34
Annexe	

La liste des abreviations

ω3	Oméga-3
ω6	Oméga-6
ADH	Alcool Déshydrogénase
APX	Ascorbate Peroxydase
DHA	Acide docosahexaénoïque
DRO	Dérivés Réactives de l'Oxygène
EPA	Acide Eicosapentaénoïque
GOT	Glutamate Oxaloacetate Transaminase
GPX	Glutathion Peroxidase
GR	Glutathion Reductase
GST	Glutathion S-Transferase
ITS	Internal Transcribed Spacer
MDA	Malondialdehyde
MLEE	Electrophorèse Multilocus des Enzymes
OB	Globules Lipidiques Cytoplasmiques (Oil body)
PSI	Photosystème I
PSII	Photosystème II
ROS	Espèces Réactives d'Oxygène
RuBisCo	Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase-Oxygénase
SOD	SuperoxydeDismutases
SPV	Sulfo-Phospho-Vanilline
TAG	Triacylglycérides

Liste des figures/tableaux.

Tableau 1.1 : Diversité des microalgues eucaryotes et procaryotes, marines et d'eau douce (Sialve et Steyer 2013).....	04
Figure 1.1 : Domaines d'application des algues microscopiques (Chader et Touzi, 2001)	06
Figure 1.2 : Résumé graphique de la réaction de stress ayant une influence plus commun sur la synthèse de certains métabolites précieux importants chez les algues vertes (Skjanes <i>et al.</i> , 2013).....	08
Figure 2.1 : A) Culture de <i>Cyclotellasp.</i> sur boîte de Pétri durant la phase verte. B) Culture de <i>Cyclotellasp.</i> dans des tubes à essais. C) Culture de <i>Cyclotellasp.</i> dans des bouteilles de verre Duran de 500 ml durant la phase verte	16
Figure 3.1 : A) <i>Cyclotellasp.</i> observée au microscope photonique (grossissement x 40) en phase verte. B) <i>Cyclotellasp.</i> observée au microscope photonique (grossissement x 40) en phase de stress. C) Culture de <i>Cyclotellasp.</i> dans des bouteilles de verre Duran de 500 ml durant la phase verte. D) Culture de <i>Cyclotellasp.</i> dans des bouteilles de verre Duran de 500 ml durant la phase de stress	21
Figure 3.2 : Variation du poids sec cellulaire durant le premier et le dernier jour de la phase verte et la phase de stress.....	22
Figure 3.3 : A) Variation de la concentration en nitrate (en mg.L ⁻¹) au premier et au dernier jour de la phase verte. B) Variation du pH entre le premier et le dernier jour de la phase verte	22
Figure 3.4 : Variation de la concentration des lipides (en mg.L ⁻¹) au premier et au dernier jour, durant la phase de Stress.....	23
Figure 3.5 : A) Variation de la concentration des protéines (mg.mL ⁻¹) au dernier jour de la phase verte et de la phase de stress. B) Variation de la concentration de l'enzyme GST (μmol.mg ⁻¹) au dernier jour de la phase verte et de la phase de Stress.....	24
Figure 3.6 : Variation de la concentration de MDA (μmol.mg ⁻¹) au dernier jour de la phase verte et de la phase de stress.....	25
Figure 3.7 : Profils protéiques des cultures de <i>Cyclotellasp.</i> (V : phase verte, S : phase de Stress)	26

Introduction

Introduction générale

On regroupe sous le terme microalgue les algues microscopiques et les cyanobactéries (dénommées également phytoplancton), sont définies comme étant des organismes unicellulaires ou pluricellulaires indifférenciés. Sous cette désignation, elles constituent un sous-ordre des Eucaryotes ou des Procaryotes. Une cellule de micro-algues mesure quelques microns à plusieurs centaines de microns. Certaines espèces présentent des structures pariétales polysaccharidiques et protéiques plus ou moins complexes en fonction de résistance aux lyses enzymatiques et à certaines substances toxiques. Ces structures sont différenciées dans plusieurs types des micro-algues (Sialve et Steyer, 2013).

Ces microorganismes photosynthétiques peuplent les océans et les cours d'eau depuis trois milliards et demi d'années (Person *et al.*, 2011). Elles sont présentes aussi dans les sols, les rochers et les arbres comme certaines micro-algues se développent dans les eaux de fonte de la glace ou de la neige (Sialve et Steyer, 2013). C'est un groupe très divers d'organismes qui sont capable de se multiplier sous des conditions variables. Elles se trouvent à des températures élevés ou basses, des intensités lumineuses variables, différents pH, des concentrations élevées en sel, dans les sources chaudes de désert ou en symbiose avec les animaux (Barsanti *et al.*, 2008 ; Skjanes *et al.*, 2013). Elles sont à la base de la chaîne alimentaire aquatique et sont colonisées presque tous les biotopes (Wijffels *et al.* 2013). Ces microorganismes représentent une source illimitée et largement inexploitée de diversité biologique.

Selon les espèces des microalgues différents composés actifs peuvent être extraits de la biomasse, ils regroupent des pigments, des polysaccharides, triglycérides, des acides gras, des vitamines et des antioxydants, ces métabolites présentent un intérêt pour plusieurs secteurs industriels (par exemple : des produits pharmaceutiques, cosmétiques, nutraceutiques, des aliments fonctionnelles, l'aquaculture ... etc.) (Cuellar-Bermudez *et al.*, 2015).

Notre étude a pour objectifs de faire une mise au point d'un procédé pour la culture des microalgues dans des conditions contrôlées, d'étudier la réponse physiologique de la souche *Cyclotella* sp. au cours du processus de la caroténogénèse et également de suivre les changements des protéines et des enzymes au cours de ce processus, et dans le but d'optimiser

la production des caroténoïdes secondaires une combinaison de différents types de stress est appliqués.

Les données bibliographiques sont présentées dans la première partie de ce mémoire, avec une présentation générale des micro-algues, ce qu'elles sont en tant qu'organismes, ainsi que les applications biotechnologiques et l'importance de ces microorganismes pour la synthèse des métabolites bioactifs généralement, les caroténoïdes et les lipides avec les différentes utilisations de ces composants. La deuxième partie décrit le matériel biologique et l'ensemble des méthodes utilisées dans notre étude. Les étapes suivies dans l'exploitation de nos résultats aussi que leurs discussion sont présentées dans la troisième partie, et en termine par une conclusion générale.

Revue bibliographique

Les microalgues

Les microalgues présentent une diversité plus grande que celle de toutes les plantesterrestres. Ces organismes constituent un groupe polyphylétique et très diversifié de procaryotes (les algues bleues ou cyanobactéries) (Borowitzka, 2013), et eucaryotes (où l'on retrouve les algues vertes, rouges et brunes) (Gaël et Bruno, 2014).

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. Les algues rouges et vertes appartiendraient à une même famille (Plantae) et seraient apparues il y a deux milliards d'années. Les algues brunes et les diatomées seraient issues d'une association d'une micro-algue rouge et d'un organisme unicellulaire hétérotrophe, apparues il y a un milliard d'années elles forment la famille des Chromalvéolates. À noter que certains travaux rapprochent les algues rouges des algues brunes en prenant en considération des marqueurs biogénétiques différents.

Les cyanobactéries sont des algues bleues procaryotes dont la principale espèce cultivée est la spiruline. Apparues il y a environ 3,8 milliards d'années elles auraient permis la production d'oxygène dans l'atmosphère en réalisant la photosynthèse. Leurs cellules ont une structure procaryote typique des bactéries. La photosynthèse se produit directement dans le cytoplasme. Elles seraient à l'origine des chloroplastes des cellules eucaryotes, et auraient ainsi permis aux végétaux de réaliser la photosynthèse, à la suite d'une endosymbiose.

Chez les microalgues eucaryotes la photosynthèse se produit dans des structures particulières, entourées d'une double membrane plastidiale, qu'on appelle chloroplastes. Ces organites cellulaires contiennent de l'ADN et sont similaires aux cyanobactéries validant l'hypothèse de l'endosymbiose.

La biodiversité des microalgues est énorme, elle est estimée entre 200.000 et plusieurs millions d'espèce. Cette diversité constitue un réel potentiel pour la recherche et l'industrie (Cadoret et Bernard, 2008). La classification (**Tableau 1**) de cette diversité est complexe et la taxonomie est sujette à de fréquents bouleversements du fait notamment de l'utilisation des techniques de phylogénie moléculaire (Sialve et Steyer, 2013).

Tableau 1.1 : Diversité des microalgues eucaryotes et procaryotes, marines et d'eau douce (Sialve et Steyer, 2013).

Règne	Embranchement/Classe
Procaryotes	Cyanophytes
	Prochlorophytes
Eucaryotes	Bacillariophytes
	Charophytes
	Chlorophytes
	Chrysophytes
	Cryptophytes
	Dinophytes
	Euglenophytes
	Glaucophytes
	Haptophytes
	Phaeophytes
	Rhodophytes

2. Mode de vie et reproduction des microalgues

Plusieurs espèces de microalgues sont capables de passer d'une croissance photoautotrophe (grâce à la lumière qui fournit l'énergie pour convertir le CO₂ 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. Certaines algues peuvent également se développer par mixotrophie en combinant les deux modes (Sialve et Steyer, 2013). 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). (Person *et al.*, 2011).

Leur développement fait intervenir plusieurs facteurs de croissance et conditions de culture comme : l'eau, les nutriments, la lumière, le CO₂, la température et le pH de la culture, ainsi que l'agitation. En fonction des souches cultivées l'eau est douce, marine ou saumâtre (Barra *et al.*, 2014).

L'apport en eau et sa qualité vont conditionner et influencer la culture des algues. Pour une croissance optimale en photobioréacteurs, il est souvent nécessaire de débiter la culture dans une eau stérile dépourvue de tout autre microorganisme ou molécule pouvant inhiber ou concurrencer la croissance des algues, ou au moins ensemercer avec une quantité significative de biomasse (Skjånes *et al.*, 2013).

Les nutriments nécessaires à la croissance des algues varient en fonction du mode trophique, de la souche cultivée et de la source d'eau choisie. Dans le mode autotrophe, les microalgues sont capables d'utiliser des formes minérales azotées (nitrate, nitrite, ammonium), et phosphatées (phosphate). Quel que soit le mode de croissance, les algues nécessitent également du potassium, du fer et de la silice (pour les diatomées), du soufre, des métaux sous forme de traces, et des vitamines (Barra *et al.*, 2014).

2. Les utilisations des microalgues

Les microalgues sont considérées comme des véritables composantes de la biosphère, elles sont restées associées à l'histoire de la terre et présentent une grande importance pour le bien-être de l'humanité et pour la vie sur notre planète (Mallick et Mohn, 2000).

Le concept de mise en culture des microalgues dans le laboratoire a été présenté par Warburg (1919), qui a cultivé *Chlorella* pour des fins de recherche de la photosynthèse. Les premières tentatives pour la culture de masse des microalgues ont été réalisées dans les années 1950, avec *Chlorella* dans le Massachusetts et Tokyo (Doucha et Lívanský; 2006). En Asie du Sud-Est le développement commercial des cultures des microalgues à un stade précoce; en 1977 il y avait 30 usines de *Chlorella* à Taiwan (Skjånes *et al.*, 2013). Elle a été suivie dans les années 1980 par la commercialisation de β -carotène de *Dunaliella salina* (Ben-Amotz et Avron, 1983). Ainsi que des travaux sur ces microorganismes ont été initiés à la suite de choc pétrolier de 1973 par le laboratoire nationale de l'énergie renouvelable pour la production du biocarburant (Cadoret et Bernard, 2008). La fossile biomasse des diatomées de microalgues a été utilisée par Alfred Nobel pour l'adsorption de la nitroglycérine pour créer la dynamite (Pluz et Gross, 2004).

Les microalgues ont un intérêt notable parce qu'elles présentent un taux de croissance plus important à celui des plantes supérieures et une fraction protéiques remarquable, ont alors positionnés comme un gisement d'intérêt à l'avenir (Sialve et Steyer, 2013).

La biomasse des microalgues est couramment utilisée pour l'alimentation de l'aquaculture, ainsi que pour la nourriture des autres animaux. Les extraits des microalgues peuvent être utilisés pour la production de cosmétiques et de nombreux produits pharmaceutiques différents (Skjånes *et al.*, 2013).

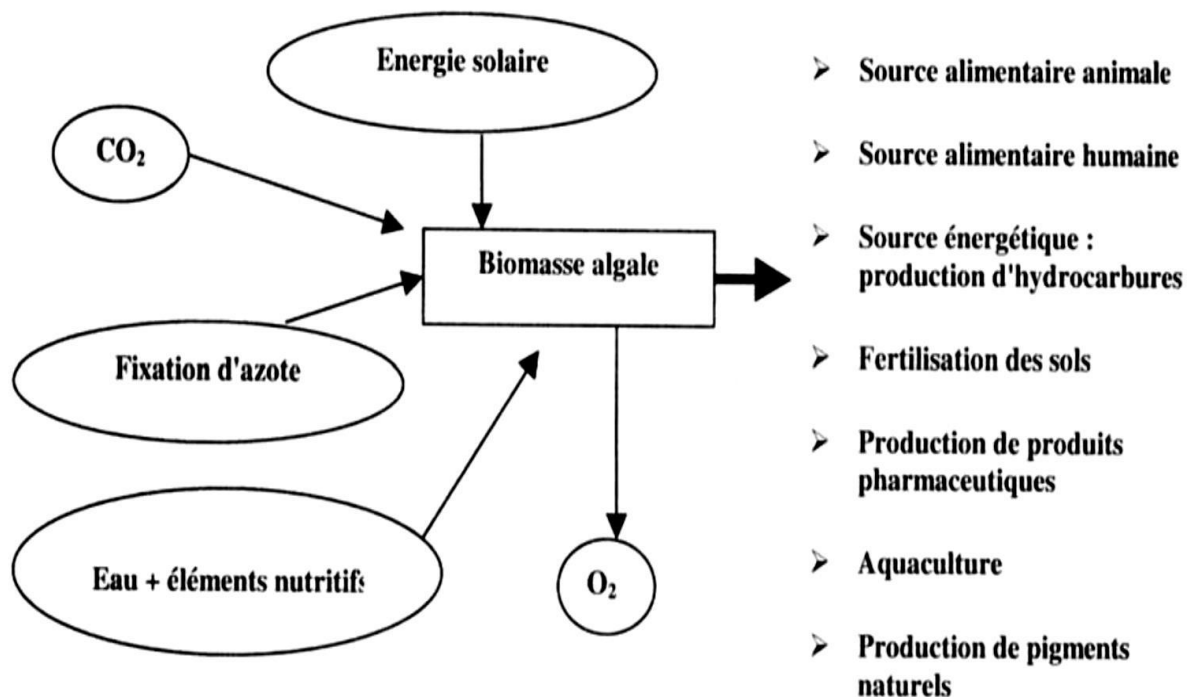


Figure 1.1 : Domaines d'application des algues microscopiques (Chader et Touzi, 2001).

Les microalgues vertes pendant plusieurs décennies ont été produites pour l'exploitation commerciale, avec des applications allant des aliments de santé à la consommation humaine, l'aquaculture et l'alimentation animale (Skjånes *et al.*, 2013). En nutrition humaine et animale, deux approches de valorisation existent : la première consiste à viser une consommation de la microalgue entière, la deuxième concerne l'extraction, la transformation et le conditionnement de molécules bioactives (Gaël et Bruno, 2014). Actuellement, la production mondiale de microalgues était estimée à un peu plus de 10 000 tonnes de matière sèche par an (Sialve et Steyer, 2013).

Les microalgues possèdent des atouts supplémentaires : il est possible d'orienter et d'adapter leur composition biochimique et elles n'induisent pas de risques de transmission de pathogènes aux êtres vivants nourris, puisqu'il s'agit d'une biomasse végétale (Gaël et Bruno, 2014). Un certain nombre de métabolites d'intérêt sont extraits de la dizaine des espèces exploitées industriellement à l'heure actuelle. Parmi ceux-ci, les caroténoïdes sont utilisés comme antioxydants (Astaxanthine) et comme colorants à usage alimentaire, pharmaceutique et cosmétique (β -carotène, phycobiliprotéines) (Sialve et Steyer, 2013).

Font également l'objet de nombreuses recherches portant sur la prévention et le traitement des cancers. Parmi les métabolites connus figurent les acides gras polyinsaturés de types $\omega 3$ (EPA, DHA) et $\omega 6$ (acide γ -linoléique, et acide arachidonique, AA). Ces lipides auraient des effets protecteurs vis-à-vis de maladies cardiovasculaires et de cancers (Gaël et Bruno, 2014).

Les microalgues ont la capacité de produire d'autres composés aux propriétés antifongiques, antibactériennes, antivirales et antihistaminiques comptent également parmi les molécules à intérêt pharmaceutique (Sialve et Steyer, 2013).

Plusieurs extraits de microalgues se retrouvent déjà dans le marché de la cosmétique, par exemple l'astaxanthine a été reconnue pour avoir des propriétés protectrices contre les rayons ultraviolets et elle a été ajoutée à certains produits. Les cosmétiques à la base de lipides (crèmes et lotions) peuvent bénéficier d'extraits de microalgues pour ces propriétés nutritives et protectrices pour la peau (Pluz et Gross, 2004).

3. Effets des différents types de stress sur les cellules algales

Différents types de stress ou de leurs combinaison peuvent induire la production de certains métabolites de haute valeur à partir des microalgues. La réponse des cellules algales au stress diffère d'une souche à une autre. La **Figure 1.2** représente un schéma graphique des réactions de stress ayant une influence plus commune sur la synthèse de certains métabolites précieux importants chez les algues vertes (Skjanes *et al.*, 2013).

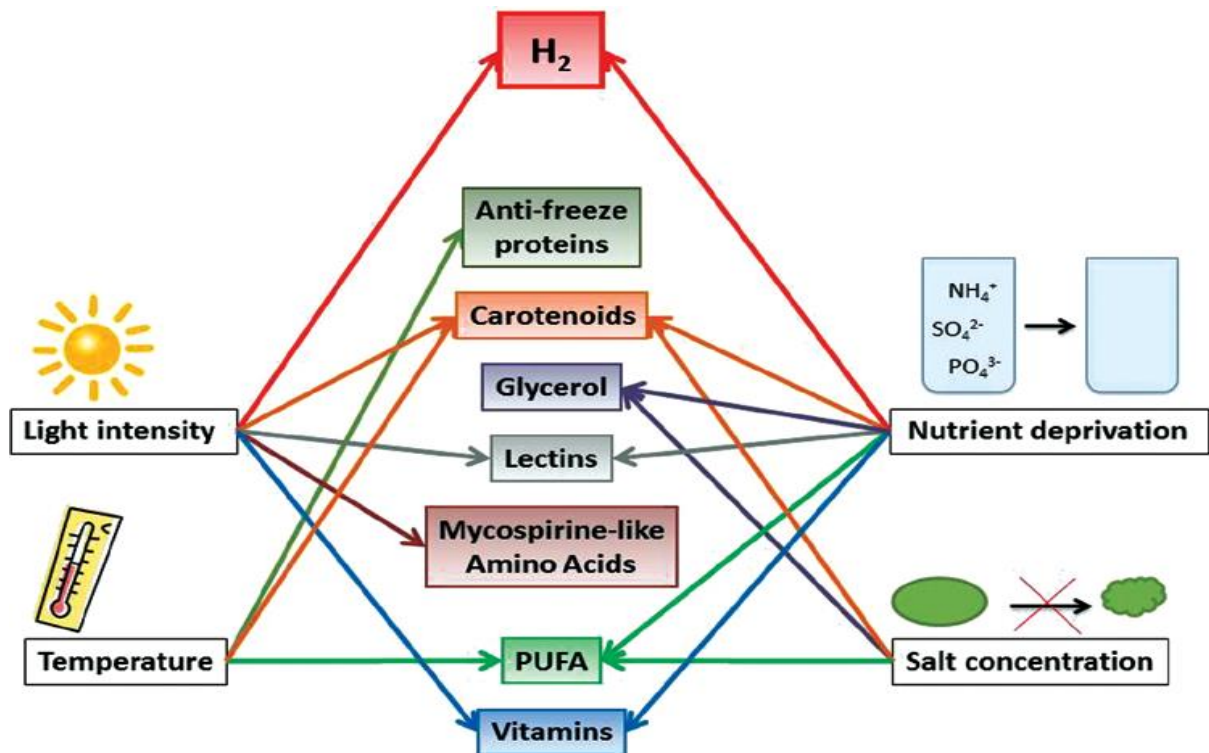


Figure 1.2 : Résumé graphique de la réaction de stress ayant une influence plus commun sur la synthèse de certains métabolites précieux importants chez les algues vertes (Skjanes *et al.*, 2013).

3.1. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif est provoqué par un déséquilibre entre les espèces réactives et les antioxydants (Ledford et Niyogi, 2005). Les principaux radicaux libres, y compris l'hydroxyle, le superoxyde et l'oxyde nitrique, sont considérés comme des DROs. Les antioxydants sont des régulateurs de la production des DROs et préviennent les effets délétères (Defraigne et Pincemail, 2008). Certaines espèces des microalgues vertes unicellulaires accumulent dans des conditions défavorables des quantités élevées de caroténoïdes dans le but de contrer l'effet délétère de ces radicaux libres. Ces caroténoïdes secondaires ne sont pas impliqués dans la photosynthèse et sont localisés en dehors de thylakoïde par contre les caroténoïdes primaires ou photosynthétiques sont associés au thylakoïde (solovchenko *et al.*, 2013).

3.2. L'intensité lumineuse

La lumière solaire est la forme d'énergie la plus abondante et la plus distribuée sur terre. Ce flux constitue la ressource énergétique qui va permettre l'incorporation du carbone dans les

biomasses photosynthétiques (Sialve et Steyer, 2013). L'augmentation de l'intensité lumineuse peut causer des dommages conséquents pour les cultures algales (Skjanes *et al.*, 2013), face à des intensités lumineuse élevés, le flux linéaire de transfert des électrons au niveau de la chaîne chloroplastique peut être perturbé au niveau des cytochromes et ferrédoxines, générant des DRO (Stirbet et Govindjee, 2011). De plus, l'enzyme ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygénase (RuBisCo) produit le phosphoglycolate lors de la voie de photorespiration; ce métabolite est hydrolysé en glycolate et ensuite oxydé en glyoxylate et H₂O₂, ce dernier est un agent oxydant puissant et toxique pour la cellule (Mallick et Mohn, 2000). Les dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) sont générés au cours du métabolisme aérobie et des processus pathologiques. Ils peuvent endommager des molécules biologiques importantes comme les lipides, l'ADN ou les protéines et sont impliqués dans les maladies dégénératives (Halliwell, 1996).

Les systèmes photosynthétiques des algues sont des mécanismes efficaces de réparation pour éviter des blessures mortelles pour les cellules (Dere *et al.*, 2007). La Photoinhibition a été trouvée pour être strictement proportionnelle à l'intensité lumineuse (Tyystjärvi, 2008), car l'intensité lumineuse élevée est essentiel pour la survie des microalgues dans des conditions stressantes irradiantes. Un procédé utilisé par les microalgues exposées à des intensités lumineuses élevées implique une réduction de la taille de l'antenne réceptrice, ce qui limite la quantité d'énergie absorbée. La protection du photosystème à un stade précoce en empêchant la formation de ROS, depuis la formation de la chlorophylle état triplet par le stress oxydatif et il peut être inactivé par l'utilisation des ROS avant leur formation. Le dommage oxydatif peut également se produire à la suite de répartition inégale de lumière absorbée entre PSII et PSI (Skjanes *et al.*, 2013). Les objectifs du système de défense secondaire pour éteindre la ROS avant qu'ils ne causent des dommages aux photosystèmes. Cette réaction est réalisée par la production des antioxydants, toutes les algues produisent un certain nombre d'antioxydants qui sont capables de piéger ces radicaux libres, les caroténoïdes peuvent être les plus connus (Varshney *et al.*, 2015). Le stress de lumière peut être utilisé en tant que mécanisme pour induire la production d'antioxydants tels que les caroténoïdes, des vitamines, l'hydroxy toluène butyle (BHT) et d'autres produits. Ces composés peuvent être extraits et utilisées dans certains nombres d'applications (Skjanes *et al.*, 2013).

3.3. La salinité

La variation de salinité peut infliger le stress hypo ou hyper osmotique sur les cellules par l'impact sur le potentiel de l'eau cellulaire et la perte / l'absorption des ions à travers la membrane cellulaire. un résultat de la plupart des variations de salinité et dans certains cas, peut être un moyen d'empêcher suffisamment des effets négatifs sur la cellule, à cause des mécanismes dans l'acclimations osmotiques (Skjanes *et al.*, 2013). Aussi les souches avec une haute capacité d'adaptation à des variations de concentrations en sel dans l'environnement sont en mesure d'augmenter leur rendement d'énergie qui améliorent la capacité de pomper les ions hors de la cellule et d'augmenter la tolérance à la salinité élevée (Alyabyev *et al.*, 2007). La tolérance à la salinité élevée est augmenté selon les conditions de lumière et de température, en plus à la limitation des éléments nutritifs (Cho *et al.*, 2007 ; Coesel *et al.*, 2008). La Photoinhibition peut par exemple augmenter sous des fortes concentrations en sel (Yao *et al.*, 2013). La salinité est l'un des types de stress qui conduit généralement à une diminution du taux de croissance. En plus, la haute tolérance à la salinité est un avantage dans la production commerciale car cette caractéristique peut être utilisé pour éviter ou limiter la contamination par d'autres espèces (Skjanes *et al.*, 2013).

3.4. Le pH

Le pH est l'un des facteurs limitant qui affectent les activités métaboliques des microalgues (Ogbonda *et al.*, 2007). Il affecte la croissance, la physiologie (Celekli et Dönmez, 2006), et également la Production de biomasse (Celekli *et al.*, 2009). Par conséquent, l'effet du pH sur lacroissance des microalgues était continuellement évalué dans différentes conditions environnementales (Celekli *et al.*, 2009). Les valeurs extrêmes du pH sont connues pour affecter le métabolisme des lipides dans les microalgues, en particulier, un pH alcalin induit à un stress qui s'accompagne d'une accumulation de TAG et de la diminution de la teneur en lipides de la membrane en raison de la réduction du fonctionnement de l'appareil photosynthétique (Guckert *et al.*, 1990).

Les modifications dans le transport d'électrons à basse pH entraîne une augmentation de la pression d'excitation du PSII dans la lumière, partiellement compensée par une plus grande capacité de transport d'électrons du PSII et l'augmentation du saturation non photochimique (Gerloff-Elias *et al.*, 2005). Le taux de photosynthèse peut être significativement plus élevé en

pH faible que sous un pH neutre, peut être comme une compensation pour augmenter le taux de respiration. Si le pH externe est faible, cela peut induire une production des protéines (Gerloff-Elias *et al.*, 2006).

3.5 Température

La température est un élément important pour la culture d'algues. Elle agit fortement sur la composition cellulaire chimique, l'absorption de nutriments, la fixation du dioxyde de carbone, et le taux de croissance pour toutes les espèces des microalgues. Le taux de croissance augmente avec l'augmentation de la température jusqu'à son optimum et une fois qu'il atteint sa vitesse optimale, la croissance diminuera considérablement avec l'augmentation de la température (Cassidy, 2011). La température a un effet majeur sur la transition de la phase lipidique membranaires, la cinétique des enzymes cellulaires, et le système de transport actif à travers les membranes (Quinn et Williams, 1983). Le taux de croissance de microalgues peut être stimulé, et les cellules deviennent plus petites à des températures plus élevées (Rijssel et Gieskes, 2002). Bien que la température de croissance élevée était liée à une diminution significative de la teneur en protéines et l'augmentation des lipides et des glucides dans l'espèce *Spiruline* (Tomaselli *et al.*, 1988 ; Oliveira *et al.*, 1999), la réponse des microalgues à haut températures varie d'une espèce à l'autre (pour les compositions chimiques et la croissance), (Thompson *et al.*, 1992 ; Renaud *et al.*, 1995). Bien que la température peut être un facteur limitant la croissance des microalgues, on considère que la température optimale est de 30 °C (Ogbonda *et al.*, 2007).

3.5. La carence d'azote

La limitation de la croissance photosynthétique dans la nature est très souvent causée en limitant l'accès des nutriments en particulier le principale nutriment qui est l'azote (N). L'azote compte pour 7 à 10 % de la composition de la biomasse. C'est un élément indispensable au métabolisme cellulaire qui intervient notamment dans la synthèse de protéines fonctionnelles et structurelles (Sialve et Steyer ; 2013). Ce facteur déterminant la quantité de caroténoïdes et l'initiation de l'accumulation de caroténoïdes secondaires dans les microalgues (Boussiba et Vonshak, 1991). La limitation de l'azote dans l'initiation de caroténogénèse augmente la production des caroténoïdes secondaires dans l'

Haematococcus et d'autres microalgues (Boussiba, 2000). Aussi la carence d'azote conduit à une baisse des niveaux de la lutéine xanthophylle dans les cultures, mais la concentration de lutéine dans ces cultures a été doublée lorsque le nitrate a été augmenté dans le milieu (Del Campo *et al.*, 2000). Les concentrations élevées d'azote favorisent l'accumulation de lutéine, ce qui peut refléter une importance pour la synthèse des protéines. Sous la carence d'azote, l'accumulation de l'acide oléique en lipides, principalement en triglycérides (TAG), a été corrélée linéairement avec l'accumulation d'astaxanthine mono-ester (Zhekisheva *et al.*, 2005). D'autres études suggèrent que l'appauvri d'azote externe, provoque une augmentation de caroténoïde / chlorophylle, et cela nécessite de l'énergie qui pourrait être lié à la dégradation partielle de la membrane du chloroplaste de la cellule, ce qui provoque une baisse de la teneur en lipides polaires pendant la période de culture (Eonseon *et al.*, 2003). Le contrôle des apports azotés constitue le mode de régulation le plus efficace et le plus employé pour réguler la synthèse et le stockage de composés organiques de réserve dans la cellule : lipides, sucres et pigments (Sialve et Steyer, 2013).

4. La caroténogénèse et la production des caroténoïdes par les microalgues

Les microalgues constituent une source potentielle pour la production de composés biochimiques à forte valeur ajoutée comme les pigments (Lex de Boer, 2014). Des études récentes ont indiqués que les microalgues peuvent être utilisées comme une source naturelle pour la production de composés bioactifs tel que les caroténoïdes, qui sont des molécules bioactives avec une activité antioxydante élevée (Aburai *et al.*, 2015).

Les caroténoïdes sont les pigments les plus courants dans la nature et sont synthétisés par tous les organismes photosynthétiques (Vilchez *et al.*, 2011). Tel que cyanobactéries, algues et des plantes, ainsi que des microorganismes non photosynthétiques, tels que des champignons et des bactéries, (Botella-Pavía *et al.*, 2006). Les caroténoïdes sont considérés comme des molécules clés pour la vie. Elles présentent plusieurs fonctions biologiques pertinentes pour la vie sur terre. Les propriétés biologiques de caroténoïdes permettent une large gamme d'applications commerciales (Vilchez *et al.*, 2011).

Les premiers rapports qui déterminent la structure de β -carotène sont faits par Richard Kuhn et Paul Karrer en 1928-1930, depuis 700 caroténoïdes naturels ont été décrit avant 2004. On

estime que la production annuelle de caroténoïde dans le monde entier par la nature est estimés à 100 millions de tonnes et plus de 20 nouvelles structures sont signalés chaque année (Maoka., 2009 ; Gómez-García et Ochoa-Alejo, 2013).

Les caroténoïdes sont des pigments naturels qui fournissent une série de couleurs, y compris jaune, orange et certaines couleurs rougeâtres (Cazzonelli, 2011). Les caroténoïdes sont surtout présents au niveau intracellulaire et les membranes des chloroplastes (Gómez- García et Ochoa-Alejo, 2013). Possédant une structure aliphatique ou alicyclique (Vincent, 1988), ils sont des pigments lipophiles avec structure isoparanoïdes (Skjanes *et al.*, 2013), qui se compose de huit unités isoprène (ip) attachées dans un modèle tête-queue où l'ordre de double liaison est inversé au centre de la molécule (Gómez-García et Ochoa-Alejo, 2013), ils dérivent d'une chaîne de polyène avec 40 carbone, qui peut être envisagé que leur effet moléculaire et leur propriétés chimiques associées y compris les caractéristiques d'absorption de la lumière qui sont essentiels pour la photosynthèse et en général pour la vie en présence de l'oxygène (Del Campo *et al.*, 2007; Guedes *et al.*, 2011).

Tous les caroténoïdes impliqués directement dans la photosynthèse sont appelés les caroténoïdes primaires, elles sont généralement localisées dans la membrane des thylakoïdes (Guedes *et al.*, 2011). Ils agissent comme pigment accessoire dans la récolte de la lumière pendant la photosynthèse (Aburai *et al.*, 2015). Des exemples de caroténoïdes primaires sont : α -carotène, β -carotène, la lutéine, violaxanthine, la zéaxanthine et néoxanthine (Leya *et al.*, 2009). Cependant, les Caroténoïdes secondaires sont présent dans les cellules, les vésicules, soit dans le stroma du plastide ou le cytosol lipidiques (Guedes *et al.*, 2011). Les caroténoïdes secondaires comprennent l'astaxanthine, canthaxanthine et échinénone (Leya *et al.*, 2009). Ces caroténoïdes sont capables de protéger l'appareil photosynthétique de l'excès de la lumière par balayage des espèces réactifs de l'oxygène (Aburai *et al.*, 2015). Beaucoup de caroténoïdes montrent un effet antioxydants naturels très puissants (Fiedor et Burda, 2014), qui est utilisé pour protéger les organismes contre le stress oxydatif ; en réponse à différents facteurs environnementaux, comme l'exposition à une forte intensité lumineuse, une carence en nutriments, les changements de température, haute ou faible pH, et la salinité élevée (Skjanes *et al.*, 2013).

Environ 30 types de caroténoïdes peuvent avoir des fonctions dans la photosynthèse, et d'autres peuvent être des intermédiaires de caroténogénèse ou caroténoïdes accumulés. Certains caroténoïdes ne se trouvent que dans certaines divisions ou classes d'algues; par conséquent, ces caroténoïdes et aussi chlorophylles peuvent être utilisés comme marqueurs chimiotaxonomiques (Takaichi, 2011). Les caroténoïdes ont plusieurs fonctions dans les microalgues: ils sont impliqués dans la récolte de lumière, mais contribuent également à stabiliser la structure et de l'aide dans la fonction photosynthétiques des complexes qui trempe la chlorophylle à son États triplets. L'activité antioxydant intrinsèque de caroténoïdes constitue la base pour leur action protectrice contre le stress oxydatif (Guedes *et al.*, 2011), cependant, toutes les activités biologiques revendiquées pour les caroténoïdes sont liés à leur aptitude à inactiver les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène (Fiedor et Burda, 2014).

De nombreuses études expérimentales confirment que les caroténoïdes peuvent aussi jouer des rôles importantes dans la prévention et même le traitement des maladies humains par exemple : le cancer, des problèmes cardiovasculaires, l'athérosclérose, l'arthrite rhumatoïde, la dystrophie musculaire et certains troubles neurologiques, ces activités biologiques des caroténoïdes sont expliqués par leurs caractéristiques comme antioxydants, anti-inflammatoires et anti-tumorales (Gedes *et al.*, 2011), de plus, les caroténoïdes ont également la capacité de stimuler le système immunitaire (Fiedor et Burda ; 2014), et potentiellement impliqués dans plus de 60 maladies (Gedes *et al.*, 2011). Au cours de ces dernières années, la production de caroténoïdes est devenue l'une des activités les plus réussies dans la biotechnologie des micro-algues. La demande pour les caroténoïdes obtenus à partir de sources naturelles est en augmentation. Cela a favorisé d'importants efforts pour améliorer la production de caroténoïdes à partir de sources biologiques au lieu de la synthèse chimique (Vilchez *et al.*, 2011).

Matériels et Méthodes

2. Matériel et Méthodes

Les expériences de culture et d'analyse biochimiques ont été effectuées conjointement au laboratoire de biologie et environnement université des frères Mentouri (Constantine) et au laboratoire de biochimie génétiques et biotechnologies végétales, université des frères Mentouri (Constantine).

2.1. Souche de microalgue étudiée

Cyclotella sp. a été isolée dans l'oasis de Sid Ahmed Timmi, altitude de 252 à 282 m, 0° 15' de longitude Est, 27° 45'N en latitude près de Tamentit à Adrar, dans le Sahara Algérien. Afin d'apparenter et de caractériser la phylogénie de la souche isolée à l'espèce correspondante, une analyse de la séquence ITS (Internal Transcribed Spacer) de la région de l'ADN ribosomal nucléaire 18S-28S a été réalisée. Une recherche BLAST a été utilisée pour comparer les similitudes entre la souche isolée et d'autres espèces apparentées. La souche atteint 99.6% de similarité avec *Cyclotella* sp. (Grama *et al.*, 2014).

2.2. Milieux de culture et croissance cellulaire (phase verte)

La souche *Cyclotella*. sp a été maintenue en culture axénique sur milieu solide (boîte de pétrie) composé de 3N-BBM+V modifié (Collection de la culture d'algues et de protozoaires, <http://www.ccap.ac.uk/>) additionné de 1,0 g L⁻¹ d'acétate de sodium trihydrate, 2,0 g.L⁻¹ Bacto™ tryptone, 2,0 g.L⁻¹ Bacto™ d'extrait de levure et 15 g.L⁻¹ d'agar. La composition du milieu 3N-BBM+V modifié est donné en annexe (**Annexe 1**).

La purification des cultures algales ce fait par des repiquages successifs sur des boîte de pétries. Le maintien de la stérilisation des souches est très important avant d'entamer les cultures de croissance sur milieu liquide et également avant d'entamer n'importe quelle étude sur ces microorganismes.

Les cultures liquides de *Cyclotella*. sp ont été préparées en transférant une ansé de la culture du milieu solide dans des tubes à essai de 10 ml de milieu de culture. Ces cultures stériles, en milieux liquides ont été utilisées pour inoculer les pré-cultures en phase verte de croissance. La stérilisation des milieux de culture et l'entretien ont été obtenus par passage à l'autoclave pendant 20 min à 121 °C à 1,6 bar. Les vitamines ont été ajoutées aux milieux de culture après la stérilisation de ces derniers par filtration pour éviter la dénaturation de ces molécules.

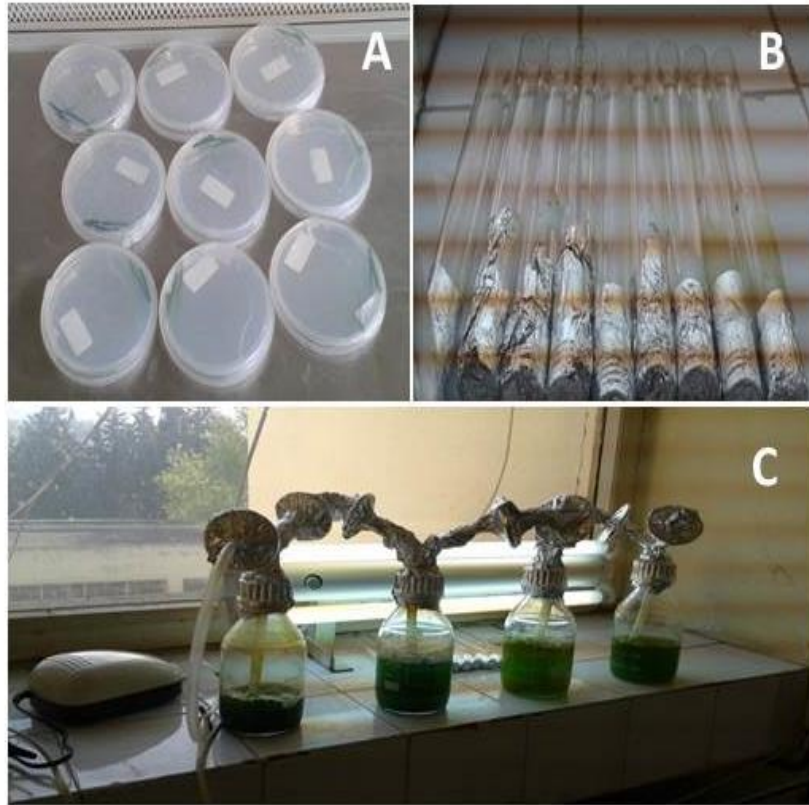


Figure 2.1 : A) Culture de *Cyclotella*. sp sur boîte de Pétri durant la phase verte. B) Culture de *Cyclotella*. sp dans des tubes à essai. C) Culture de *Cyclotella*. sp dans des bouteilles de verre Duran de 500 mL durant la phase verte.

Un volume de 10 mL de culture algale cultivée dans des tubes à essai a été utilisé pour inoculer des bouteilles de verre Duran de 500 ml avec un volume de culture de 450 mL de milieu de culture. À ce moment-là, l'ensemble des conditions pour une croissance optimale des cultures (composés nutritifs, agitation, source de lumière) est présent. Les cultures ont été aérées en faisant barboter de l'air filtré à travers un tube de silicone (diamètre : 6 mm), l'air a été fourni par une pompe d'air pour aquarium.

Aussi l'air utilisé doit passer à travers une bouteille d'eau distillé afin d'introduire un air humide pour les cultures algales pour éviter une évaporation du milieu. Les cultures ont été cultivées en double sous une température ambiante avec une intensité lumineuse fournie par des lampes blanc froid de 18W (**Figure 2.1C**). La phase de croissance de *Cyclotella* sp. en pré-culture a été préparée pour fournir de l'inoculum avec le stress en nitrate pour les expériences de caroténogénèse. Les cultures de la phase verte ont été suivies pour une durée de dix jours. Lorsque la concentration mesurée de NO_3^- été inférieure à $5,48 \pm 0,23 \text{ mg L}^{-1}$, les cellules vertes ont été utilisés comme inoculum pour les expériences de caroténogénèse.

2.3. Cultures en phase de caroténogénèse

Le processus de caroténogénèse chez les microalgues est induit par divers facteurs de stress et surtout leurs combinaisons. Les combinaisons de stress osmotique, la carence en azote et le stress oxydatif causé par les fortes intensités lumineuses sont particulièrement efficaces (solovchenko, 2013). Différents type de stress peuvent être utilisé pour induire le processus de la caroténogénèse dans les cultures algales. Chaque type de stress est spécifique, et également pour la réponse de ces microorganismes face à ces types de stress biotique ou abiotique.

Dans notre étude, une combinaison de stress a été utilisée ; un stress lumineux représenté par une augmentation de l'intensité lumineuse (la source de lumière a été doublée), un stress nutritionnel (représenté par une carence d'un élément indispensable à la croissance cellulaire qui est le nitrate) et également un stress salin (représenté par l'ajout du NaCl aux milieux de culture).

Après la phase de croissance, une partie de la biomasse algale a été utilisée pour inoculer la phase de la caroténogénèse. Pour l'inoculation, 25 ml de cellules en phase de croissance ($\text{NO}_3^- < 5,48 \pm 0,23 \text{ mg.l}^{-1}$) ont été dilués à 450 ml combiné avec 425 ml de 3N-BBM+V, qui était identique à 3N-BBM+V, sauf qu'il contenait de NaCl et sans nitrate. Cela a résulté des stress nutritionnels et osmotiques, comme rapporté par Grama *et al.*, (2014a). Les cultures ont été cultivées en double pour une durée de 14 jours. Au cours de la phase de stress les microalgues produisent les caroténoïdes secondaires, les lipides et les enzymes antioxydants comme des composants protecteurs qui peuvent réduire les stress oxydatifs.

3. Analyses biochimiques des extraits produits

Les analyses biochimiques des extrait pour les deux phases de croissance ; phase verte et la phase de stress ont été effectuées en double exemplaires, les analyses sont basées sur les techniques décrite par Grama *et al.*, (2014).

3.1. Analyse des lipides

Les lipides ont été extraits à l'aide de la méthode d'extraction de Folch modifiée (Folch *et al.*, 1957) et la méthode de quantification sulfo-phospho-vanilline (SPV) de Chabrol (Chabrol et Castellano, 1961). Un échantillon de 1.0 ml de culture cellulaire a été récolté et centrifugé pendant 3 min à 5000g et le surnageant a été éliminé. Après la lyse cellulaire, une solution de 0,8% de NaCl (0,6 ml) a été ajoutée aux extraits mis en commun, centrifugé

pendant 3 min à 5000g, la couche supérieure enlevée et la couche inférieure séchée à 40 °C. Ensuite, on a ajouté 0,2 ml de H₂SO₄ (95-97%) et chauffé à 90 °C pendant 10 min. Après refroidissement, on ajoute 5,0 ml de réactif PV (1,2 g.L⁻¹ de vanilline dans l'acide phosphorique 68% conservé dans le noir), les portions étaient mélangées au vortex et l'absorption des volumes de 2 ml a été mesurée à 525 nm dans un lecteur spectrophotométrique. La teneur en lipides a été déterminée par comparaison avec une courbe de calibration préparée à partir de l'étalon de l'huile de soja, 5, 10, 20 et 50 mg.ml⁻¹ à partir d'une solution de l'huile de soja de 100 mg.ml⁻¹ (Grama *et al.*, 2014)

3.2. Analyse des nitrates

Les cellules ont été séparées du surnageant (1,0 ml de culture) par centrifugation dans des tubes Eppendorf de 2,0 ml à 5000g pendant 5 min. Le surnageant a été enlevé et 400 µl de ce dernier a été dilué dans 10 ml d'eau distillée. La concentration de NO₃⁻ a ensuite été mesurée selon une méthode établie précédemment (Rice *et al.*, 1998).

L'absorbance des étalons et des échantillons ont été mesurées à une longueur d'onde de 220 nm pour obtenir la teneur en NO₃⁻ et une longueur d'onde de 275 nm pour déterminer l'interférence causée par la matière organique dissoute. Des solutions standards de N (0, 5, 1, 2 et 4 mg.L⁻¹) ont été utilisées pour préparer la courbe d'étalonnage, et la concentration dans les échantillons expérimentaux a été déterminée par la relation suivante :

$$Abs_{adjusted} = Abs_{220\text{ nm}} - 2 * Abs_{275\text{ nm}}$$

$$[NO_3^-]_{\mu g/mL} = 17.965 * Abs_{adjusted} + 0.186$$

3.3. Densité des cultures cellulaires

Pour déterminer la densité de la masse cellulaire sèche au sein de la culture cellulaire, 10 ml de la suspension cellulaire a été centrifugée à 2000g pendant 10 min pour séparer la masse cellulaire du surnageant. Ce dernier a été éliminé et les cellules ont été suspendues dans 30 ml de H₂O distillée et centrifugés à nouveau pendant 10 min à 2000g. Les culots ont été lavés deux fois, le surnageant a été enlevé et les culots ont ensuite été placés dans des plats en aluminium pré-pesés et séchés pendant 24 h à 80 °C avant d'être pesés à nouveau.

3.4. Dosage des protéines et des enzymes

Les protéines ont été quantifiées par spectrométrie utilisant la méthode de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) (**Annexes 2**) suivant les produits chimiques disponibles au niveau du laboratoire, une enzyme a été choisie pour notre étude : Glutathion S-Transferase (GST).

3.5. Dosage de Malondialdehyde

L'évaluation du niveau de stress oxydatif au niveau de la souche *Cyclotella sp.* a été effectuée par la détermination du niveau de la peroxydation des lipides membranaires (les acides gras polyinsaturés), elle a été réalisée par le dosage du Malondialdehyde (MDA). (**Annexes 2**).

3.6. Détermination des profils enzymatiques par MLEE

L'électrophorèse multilocus des enzymes (MLEE) a été utilisée pour apprécier la diversité des isoenzymes entre les deux phases : la phase verte et phase de stress. Suivant les produits chimiques disponibles au niveau du laboratoire, deux enzymes ont été choisies pour notre étude : La Glutamate oxaloacétate transaminase (GOT) et l'alcool déshydrogénase (ADH). Le protocole expérimental est basé sur des techniques décrites par Selander *et al.*, (1986) (**Annexe 4**).

3.7. Détermination des profils protéiques par SDS-PAGE

La diversité de la teneur protéique a été suivie, en utilisant la technique d'électrophorèse en conditions dénaturante (SDS-PAGE). Le protocole expérimental est basé sur des techniques décrites par Laemmli (1970) (**Annexe 3**).

Résultats et discussions

3. Résultats

Analyse des cultures

Après la phase de culture verte ou de production de biomasse (10 jours), les cellules ont été transférées dans un milieu de stress. À ce moment-là le processus de caroténogène a commencé. Plus précisément une combinaison de stress a été appliquée ; un stress nutritionnel (carence de nitrate), un stress lumineux (l'intensité lumineuse a été doublée) et un stress salin représenté par l'ajout du 7.5 g.L⁻¹ NaCl. La caroténogénèse a été suivie pendant une période de 14 jours. Cette combinaison de stress a eu un grand effet sur la morphologie, la physiologie et sur la croissance des cultures cellulaires.

3.1. Production de biomasse et caractérisation des cellules

Les microalgues sont des microorganismes qui possèdent une capacité d'adaptation dans un milieu de culture, où elles consomment les nutriments présents dans ce milieu, dont elles tirent l'énergie nécessaire à leurs croissances avec l'aide de la lumière lors du processus de la photosynthèse (le cas de notre étude), donc la relation entre la croissance des cellules et la quantité du substrat consommée est essentielle.

Chaque espèce des microalgues possède des conditions optimales de culture, lorsque ces conditions sont modifiées les cellules microalgales subissent un stress, ce dernier peut être de différentes natures : carence en éléments nutritifs (nitrate), un stress oxydatif, et un choc osmotique.

L'adaptation des cellules algales face à ces types de stress se traduit par des changements physiologiques et notamment des changements morphologiques. La phase de croissance cellulaire a été caractérisée également par des cellules rondes et vertes de petite taille, l'aspect microscopique des cellules après la phase de la caroténogénèse a montré de grands changements sur la morphologie des cellules. À la fin des cultures de stress, les cellules sont devenues grandes, avec une pigmentation orange (**Figure 3.1**).

Dans le processus de la caroténogénèse, la couleur de la culture de stress est représentative du pigment accumulé dans cette phase. Dans notre étude, la couleur (orange) obtenue est représentative de la dégradation des caroténoïdes primaires, notamment la chlorophylle et une surproduction ainsi qu'une accumulation de caroténoïdes secondaires qui est la cantaxanthine qui a donné cette couleur à la culture algale (Gramaet *al.*, 2014).

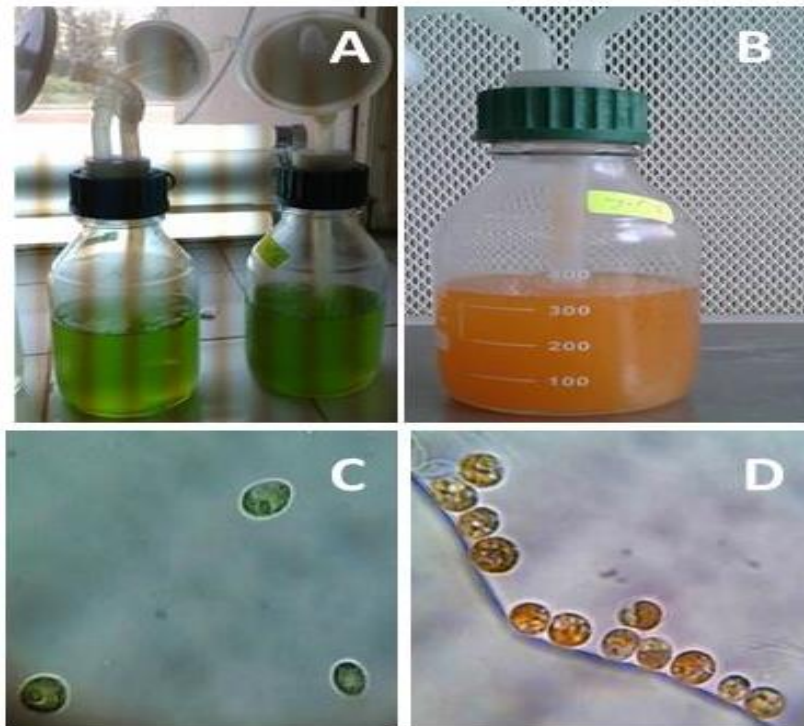


Figure 3.1 : A) *Cyclotella* sp. observée au microscope photonique (grossissement x 40) en phase verte. B) *Cyclotella* sp. observée au microscope photonique (grossissement x 40) en phase de stress. C) Culture de *Cyclotella* sp. dans des bouteilles de verre Duran de 500 ml durant la phase verte. D) Culture de *Cyclotella* sp. dans des bouteilles de verre Duran de 500 ml durant la phase de stress.

Comme le montre la **Figure 3.2**, au cours de la phase verte (conditions de culture optimale) le poids sec des cellules a augmenté. Au début de la culture, le poids sec cellulaire était de $0,16 \pm 0,04 \text{ g.L}^{-1}$ cette densité a augmentée jusqu'à $1,72 \pm 0,16 \text{ g.L}^{-1}$ à la fin de cette culture de croissance. Les composés azotés sont introduits dans un milieu de culture sous plusieurs formes tel que le nitrate, l'ammonium ou bien l'urée. Dans notre étude, la source d'azote utilisée pour la culture est le nitrate de sodium NaNO_3 . L'augmentation du poids sec a été corrélée avec la consommation du nitrate par les cellules algales. La concentration de ce dernier a diminuée de $12,77 \pm 0,91 \text{ mg.L}^{-1}$ jusqu'à $5,48 \pm 0,23 \text{ mg.L}^{-1}$ (**Figure 3.3A**). En plus, la présence du nitrate dans le milieu de culture, la variation du pH ont une grande importance sur la croissance algale. Au cours de cette phase le pH de la culture a augmenté de $7,31 \pm 0,04$ jusqu'à $9,27 \pm 0,21$ au 14^{ème} jour de la culture de croissance. Le changement du pH est le résultat de la forte activité photosynthétique ainsi au mode de culture autotrophe des cultures dans cette phase. Aussi, les résultats montrent que la souche de *Cyclotella* sp. tolère une croissance dans un milieu alcalin de pH 9.27.

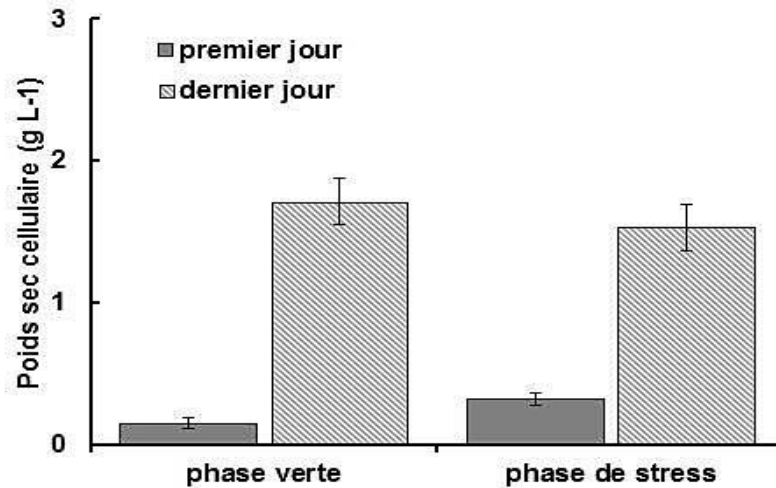


Figure 3.2: Variation du poids sec cellulaire durant le premier et le dernier jour de la phase verte et la phase de stress.

Comme le montre **Figure 3.2**, au cours de la phase de stress, le poids sec des cellules a augmenté. Au début du processus de la caroténogénèse, le poids sec cellulaire été de $0,32 \pm 0,04 \text{ g.L}^{-1}$, cette densité a augmentée jusqu'à $1,54 \pm 0,16 \text{ g.L}^{-1}$ au 14^{ème} jour de la culture de stress. Cette augmentation du poids moléculaire dans des conditions qui provoque l'arrêt de croissance des cellules à une relation avec l'accumulation des substrats produits au cours de la phase de stress.

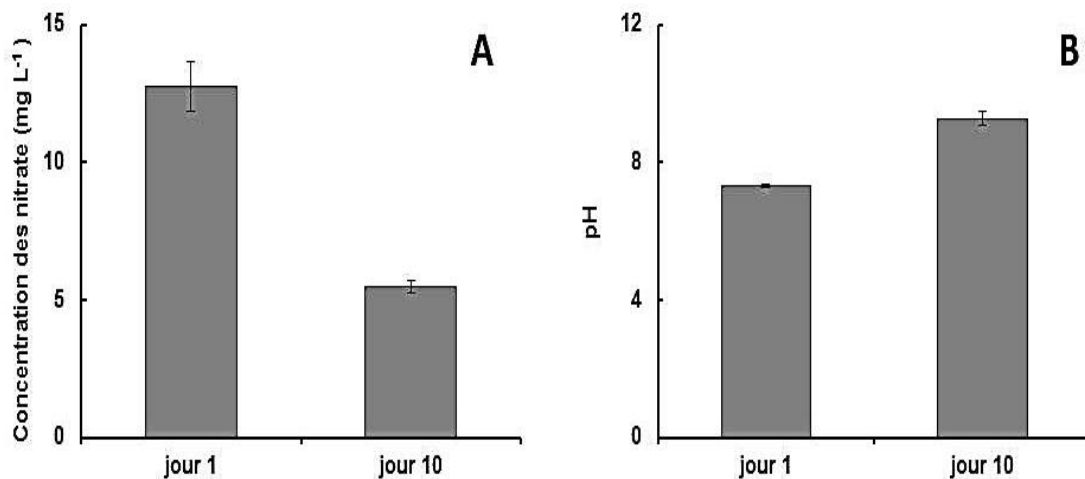


Figure 3.3: A) Variation de la concentration en nitrate (en mg.L^{-1}) au premier et au dernier jour de la phase verte. B) Variation du pH entre le premier et le dernier jour de la phase verte.

3.2. Production de pigments

La biosynthèse des chlorophylles a été affectée par les conditions de culture de stress. Au début de la caroténogénèse, les pigments photosynthétiques y compris la chlorophylle et les caroténoïdes primaires étaient prédominants. Basé sur l'aspect microscopique des cellules, après 14 jours de culture de stress, la teneur totale des chlorophylles par cellule a diminué de façon significative pour les cultures de *Cyclotella* sp. (Figure 3.1C, D), cette phase a été caractérisée par la biosynthèse des caroténoïdes secondaires, et notamment la canthaxanthine qui a donné la couleur orange à la culture cellulaire (Grama *et al.*, 2014).

Dans une étude précédente (Grama *et al.*, 2014a), et sous des conditions de stress similaire, la souche de *Cyclotella* sp. a montré une évolution intracellulaire de la canthaxanthine, astaxanthine et l'adonixanthine de culture. Cette évolution des caroténoïdes secondaires ($\pm 2,5 \text{ mg.L}^{-1}$) n'a pas pu être quantifiée par la méthode de spectrophotométrie suivant le protocole de Hansmann (1973). C'est le cas pour les autres pigments primaires et secondaires pour notre travail.

3.3. Production des Lipides

Comme la montre Figure 3.4, au début de la caroténogénèse, la concentration initiale des lipides était de $153,5 \pm 19,09 \text{ mg.L}^{-1}$, cette concentration a augmenté jusqu'à $444 \pm 45,25 \text{ mg.L}^{-1}$ au jour 14. Dans les conditions de carence en nitrate, la division cellulaire est arrêtée. Cela indique que cette augmentation de concentration, est une augmentation de la teneur lipidique intracellulaire.

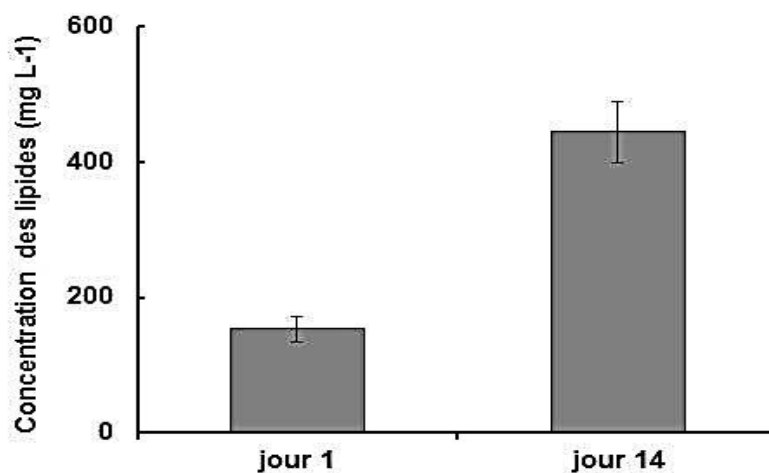


Figure 3.4: Variation de la concentration des lipides (en mg.L^{-1}) au premier et au dernier jour, durant la phase de stress.

La synthèse synchronisée des lipides et des caroténoïdes pendant le processus de caroténogénèse a été observée.

3.4. La teneur en protéine et des enzymes

Comme le montre la **Figure 3.5A**, la concentration initiale des protéines à la fin de la phase verte de croissance était de $0,29 \text{ mg.mL}^{-1}$ de culture, cette concentration a diminué jusqu'à $0,149 \text{ mg.mL}^{-1}$ de culture à la fin de la phase de stress. Des changements également de la concentration de l'enzyme qui a été étudiée sont observés entre la fin de la phase de croissance et la fin de la phase de stress (**Figure 3.5B**); une augmentation de la concentration de l'enzyme GST (Glutathion S-Transférase) de $0,104$ à $0,273 \text{ } \mu\text{mol.mg}^{-1}$ de protéine par minute.

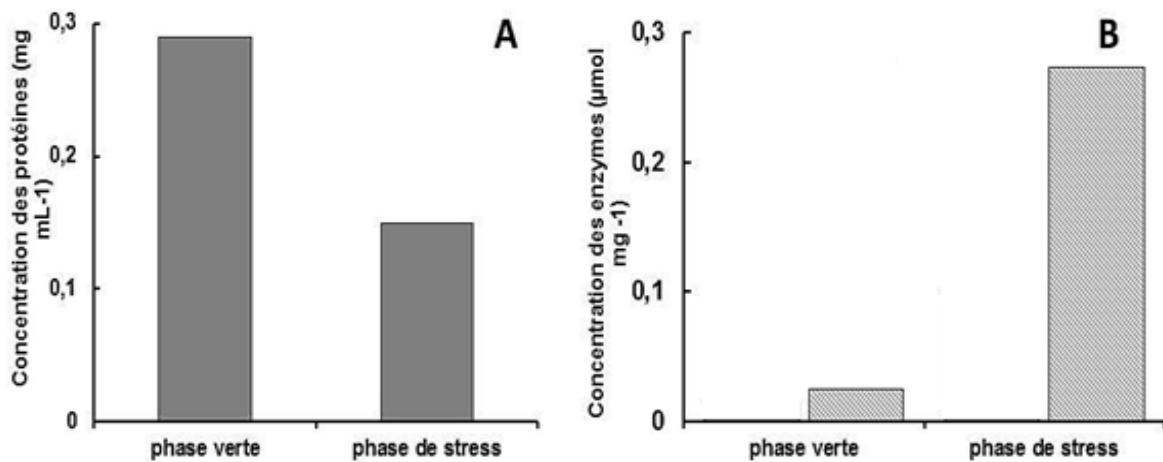


Figure 3.5: A) Variation de la concentration des protéines (mg.mL^{-1}) au dernier jour de la phase verte et de la phase de stress. B) Variation de la concentration de l'enzyme GST ($\mu\text{mol.mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) au dernier jour de la phase verte et de la phase de stress.

3.5. La concentration des sous-produits lipidiques

Des changements également de la concentration du sous-produit de la dégradation des lipides membranaires le Malondialdéhyde (MDA) qui a été étudié sont observés entre la fin de la phase de croissance et la fin de la phase de stress (**Figure 3.6**); une augmentation de concentration de MDA de $0,0134$ à $0,0253 \text{ } \mu\text{mol.mg}^{-1}$ de matière fraîche.

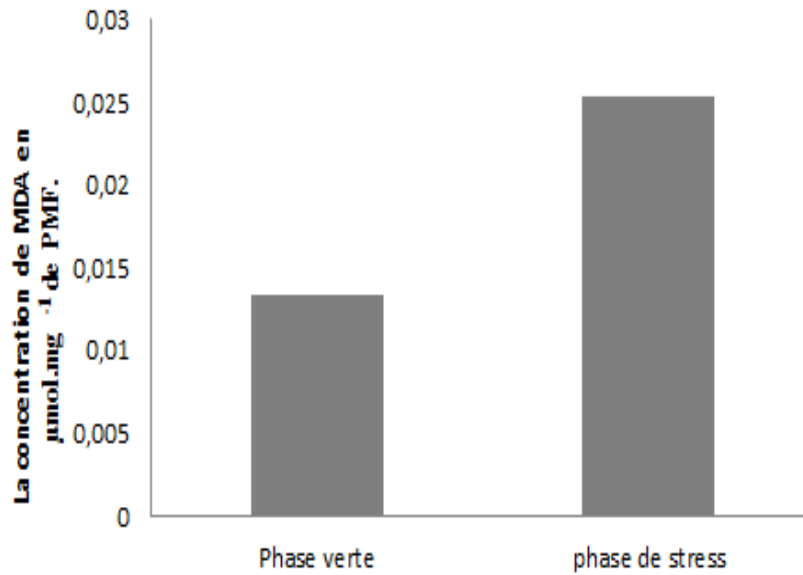


Figure 3.6 : Variation de la concentration de MDA ($\mu\text{mol.mg}^{-1}$) au dernier jour de la phase verte et de la phase de stress.

Concernant l'étude des variations de mobilité électrophorétique des enzymes Glutamate oxaloacétate transaminase (GOT) et l'alcool déshydrogénase (ADH) par la technique d'électrophorèse multilocus des enzymes (MLEE), aucune bandes enzymatique n'a pu être révélée durant cette études à cause des problèmes de mise au point du protocole pour les cultures algales, la faible concentration des enzymes dans les cultures cellulaires et également des difficultés pour la lyse cellulaire dans les conditions non dénaturantes.

3.6. Profil protéique (SDS-Page)

Le profil des protéines totales, pour les cultures en phase verte et les cultures en phase destress est représenté sur la **Figure 3.7**.

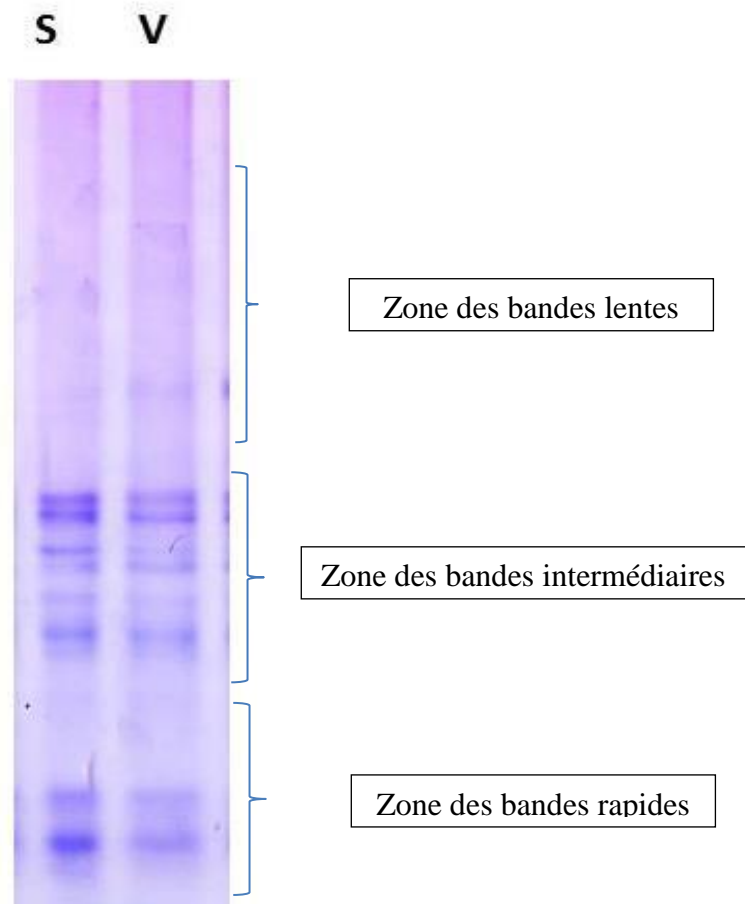


Figure 3.7: Profils protéiques des cultures de *Cyclotella* sp. (V : phase verte, S : phase de stress).

Cette méthode permet d'obtenir l'ensemble des protéines; on distingue trois groupes de bandes avec des mobilités différentes :

- Groupe des bandes lentes
- Groupe des bandes intermédiaires
- Groupe des bandes rapides

Ces diagrammes renferment plusieurs bandes électrophorétiques décelables. On constate que les diagrammes des protéines totales présentent des différences d'intensités des bandes protéiques de mobilités rapides et aussi pour les bandes protéiques de mobilités intermédiaires.

4. Discussion

Les microalgues constituent un réservoir unique de biodiversité, et avec le développement récent des techniques de culture certaines espèces des microalgues peuvent être cultivées dans des conditions optimales bien choisies par les chercheurs ce qui permet d'étudier la croissance, la morphologie, les caractéristiques et les produits de ces microorganismes, ou elles sont sélectionnées parmi nombreux microorganismes en raison de la facilité d'adaptation et la rapidité de leur multiplication, comme elles sont d'intérêt à des fins biotechnologiques en raison de la capacité d'accumuler et de stocker des métabolites secondaires et de produire efficacement des protéines fonctionnellement actives.

Le présent travail représente une continuation du travail qui a été entamé lors de l'étude de Grama *et al.* (2014) sur la souche microalgale de *Cyclotella* sp. Une mise au point d'un bioprocédé pour la culture des microalgues a été réalisée et utiliser durant notre travail. Ce dernier avait pour objectif de faire un suivi des changements protéiques et enzymatiques au cours du processus de la caroténogénèse. Après une phase de croissance et de production de biomasse, la phase de la caroténogénèse a commencé lorsque une combinaison de stress a été appliquée à la culture cellulaire ; un stress nutritionnel (carence de nitrate), un stress lumineux (l'intensité lumineuse a été doublée) et un stress salin représenté par l'ajout du 7.5 g.L⁻¹ du NaCl. Cette combinaison de stress a eu une grande influence sur l'état morphologique et physiologique des cultures algales.

La phase de croissance c'est la période où les cellules microalgales sont dans un état de multiplication cellulaire. Cette phase a été caractérisée par une forte augmentation de la concentration cellulaire (**Figure 3.2**) pendant 10 jours, cette élévation du poids moléculaire est due à l'optimisation de plusieurs facteurs importants qui ont améliorés la croissance des microalgues, cette dernière est contrôlée par un grand nombre de facteurs dont les plus importants sont : la lumière, la température, le pH, les nutriments et la concentration en CO₂. Une optimisation de tous ces paramètres étroitement corrélés permettra d'atteindre les meilleurs rendements.

La majorité des microalgues sont dites photo-autotrophes. Elles tirent leur énergie de la lumière par photosynthèse et leur principe source nutritive et le CO₂ (Maryeline *et al.*, 2013). En outre les effets de la lumière sur le taux de la croissance des microalgues varient d'une espèce à l'autre à cause de leur stratégie adaptative aux changements des conditions environnementales (Bouarab *et al.*, 2002). Les changements de ce paramètre peut être

modifiées compositions biochimiques de ces microorganismes (Belkouret *al.*, 1997). Ces derniers sont très sensibles à des fortes ou faibles intensités lumineuses (Cadoret et Bernard, 2008), parce que la lumière est l'un des facteurs qui contrôle le cours de processus physiologique des microalgues et elle détermine la quantité d'énergie disponible qui est indispensable pour le processus de photosynthèse (Krzemińska *et al.*, 2014). Ainsi, elle agit sur le taux de croissance qui va augmenter avec l'élévation de l'intensité lumineuse jusqu'à une valeur maximale correspondant à une intensité lumineuse optimale, et si les radiations lumineuses reçues sont inférieures à ce qu'exige la saturation de la photosynthèse cela limite la croissance cellulaire (Bouarabet *al.*, 2002). Par conséquent, l'intensité lumineuse augmente l'orientation préférentielle du métabolisme cellulaire vers une accumulation de certains composés (Belkouret *al.*, 1997).

Les microalgues ont besoin d'un apport de nutriment pour pouvoir croître et se diviser. L'élément le plus important est l'azote (N), celui-ci est fourni généralement sous forme de nitrate (NO_3^-) mais peut être aussi présenté sous forme d'ammoniac (NH_4^+) ou d'urée ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$). Une forte dégradation cellulaire du nitrate qui était présent dans le milieu de culture a été constatée (**Figure 3.3A**). Le nitrate est un élément essentiel pour la biosynthèse des protéines et également un élément essentiel pour la biosynthèse des différents constituants cellulaires. La diminution de nitrate dans le milieu est proportionnelle à la croissance cellulaire ce qui indique que le nutriment NO_3^- a un rôle prépondérant dans la nutrition des algues, donc la consommation du nitrate entraîne une augmentation de la biomasse (Krzemińska *et al.*, 2014). Par ailleurs, l'enrichissement du milieu de culture par des nutriments, et tout particulièrement par le nitrate conduit à l'augmentation de la production primaire des microalgues, contrairement la limitation de nitrate qui réduit la productivité de cette biomasse (Guedes *et al.*, 2011).

Le pH du milieu de culture est l'un des facteurs qui affecte sérieusement la croissance des microalgues, dont il influence beaucoup de processus liés à la croissance ou il joue un rôle dans le métabolisme, la biosynthèse de certains produits bioactifs tels que les caroténoïdes, la plupart des microalgues peuvent se développer dans une large gamme de pH entre 4 et 10 ou 11 (Khalil *et al.*, 2010). Chaque espèce des microalgues a son propre pH optimal. Ces microorganismes vont entraîner les changements de pH pour faciliter leur adaptation à des conditions défavorables dans différents milieux, et pour réaliser les fonctions biologiques nécessaires à la survie des cellules microalgales.

Naturellement, elles ont tendance à alcaliniser le milieu de culture, où le pH du milieu est maintenu à une valeur neutre. Une augmentation du pH a été constatée (**Figure 3.3B**) lors de la phase de croissance. La variation du pH peut être induite par la disponibilité différentielle des sources de carbone inorganique CO_2 , HCO_3^- , CO_3^{2-} , les changements de la prise des éléments nutritifs essentiels tels que le nitrate et le phosphore, la co-précipitation du phosphate avec du calcium, le magnésium et le carbonate ou les concentrations élevées en carbonate (Barra *et al.*, 2014).

La présence du CO_2 dissous dans le milieu a entraîné une acidification du milieu grâce à la présence des ions CO_3^{2-} et HCO_3^- résulte de l'interaction entre le CO_2 et H_2O , tandis que les microalgues consomment rapidement le CO_2 (pour réaliser la photosynthèse) ce qui conduit à une augmentation du pH, cette alcalinisation se répercute sur l'ionisation de certains ions, autrement dit si la demande en CO_2 des microalgues est plus élevée que l'apport en CO_2 dans le milieu, le pH se déplace vers les valeurs supérieures (Khalil *et al.*, 2010). Donc l'augmentation du pH est due à une réduction du CO_2 du milieu en relation avec l'activité photosynthétique au cours de la croissance des microalgues (OuldBellahcen *et al.*, 2013).

Beaucoup de microalgues ont la capacité de survivre à des conditions environnementales difficiles en raison de différentes stratégies d'adaptations, ces mécanismes d'adaptations entraînent des changements dans la physiologie des microalgues, ce qui permet la production de différents métabolites afin d'augmenter leurs chances de survie (Skjanes *et al.*, 2013). Récemment ces microalgues ont été cultivées sous certaines conditions de stress afin d'améliorer l'accumulation des protéines, des lipides, des caroténoïdes et d'autres composants bioactifs (Khalil *et al.*, 2010); les stress identifiés peuvent être de différentes natures : stress oxydative ou un stress osmotique, le stress oxydative est réalisé sous l'effet d'augmentation de l'intensité lumineuse ou bien par un choc thermique (Cadoret et Bernard, 2008). En réponse à ces différents types de stress; un processus de défense (la caroténogénèse) est induit il est caractérisé par une production et une accumulation des caroténoïdes secondaires (Han *et al.*, 2013).

Durant le processus de la caroténogénèse le poids sec des cellules a augmenté (**Figure 3.2**) malgré une carence en nitrate qui représente un élément essentiel pour la croissance cellulaire. Durant cette phase, la division cellulaire est inhibée, l'augmentation du poids sec cellulaire est due à une forte augmentation de la teneur en lipides qui a été traduite par une augmentation de la taille des cellules également (**Figure 3.1C, D**).

Cette phase de la caroténogénèse a eu une grande influence sur les changements morphologiques et physiologiques des cellules algales. Les petites cellules vertes ont été transformées en grandes cellules orange. Une augmentation du poids sec cellulaire a été constatée également durant cette phase (**Figure 3.1A, B**), la division cellulaire au cours de cette phase est stoppée à cause de la carence en nitrate. L'augmentation du poids sec est due à l'accumulation de certains composants bioactifs tel que les lipides, les caroténoïdes et d'autres substances (Skjanes *et al.*, 2013). Donc l'élévation du poids sec cellulaire est corrélée avec une production de différents composants.

En conditions de culture normale les microalgues contiennent comme tous les organismes vivants une teneur faible des lipides, qui sont principalement constitués de phospholipides et de glycolipides, la teneur en lipide peut augmenter dans les cultures algales suite à différents types de stress (Cadoret et Bernard, 2008).

Si les cellules microalgales subissent un stress en fin de la phase de croissance, elles peuvent augmenter leurs teneur lipidiques et atteindre 13% de lipide en cas d'un stress osmotique et 19% de lipide en cas de stress de nitrate (Massart *et al.*, 2010). La carence en azote dans le milieu stimule la production des lipides dans la cellule, mais ce résultat est souvent compensé par une réduction de taux de croissance.

Au cours de la phase d'accumulation des caroténoïdes, une accumulation des structures lipidiques est indispensable. L'accumulation des lipides est souvent sous forme de triacylglycérides (TAG) qui sont déposés dans des globules lipidiques cytoplasmiques (OB). Durant le processus de la caroténogénèse la teneur en lipides a fortement augmentée (**Figure 3.4**). La synthèse synchronisée des lipides et des caroténoïdes pendant le processus de caroténogénèse a été également observée.

Le processus de la caroténogénèse a été caractérisé également par une diminution de la teneur des caroténoïdes primaires et une forte augmentation des caroténoïdes secondaires, comme le montre le changement de la pigmentation cellulaire (**Figure 3.1**).

La carence en nitrate, la salinité élevée et les fortes intensités lumineuses ont été efficaces pour l'induction des caroténoïdes, cette induction est caractérisée par l'accumulation de la canthaxanthine qui a donné la couleur orange à la culture cellulaire. Ces caroténoïdes secondaires jouent un rôle très efficace dans la protection des pigments photosynthétiques, des enzymes, des membranes et des acides nucléiques contre les dommages photo-oxydants. Les

dérivés réactifs d'oxygène (DRO) peuvent interagir avec une large gamme de molécules provoquant l'oxydation des pigments, la peroxydation des lipides, la destruction de la membrane, la dénaturation des protéines et des mutations au niveau de l'ADN.

Chez les microalgues, un système de défense bien développé est représenté par les enzymes antioxydants et les caroténoïdes secondaires. Les facteurs de stress biotiques et abiotiques induisent une augmentation de la synthèse d'antioxydants non enzymatiques tels que le tripeptide thiol, le glutathion et les vitamines C (ascorbate) et E (tocophérol), ainsi que des augmentations des enzymes antioxydants telles que les superoxyde dismutases (SOD), la glutathion peroxydase (GPX), la glutathion réductase (GR), l'ascorbate peroxydase (APX) et catalases (Mallick et Mohn, 2000).

Dans notre travail, nous avons observé une augmentation de la teneur en protéines entre la phase de croissance et la phase de stress, cette augmentation de la teneur des protéines a été constatée également avec des changements du profil protéique de notre souche par l'électrophorèse des protéines (SDS-Page) (**Figure 3.7**), ces changements de la teneur et cette augmentation de la concentration est due à une augmentation de la teneur des enzymes antioxydants. Des changements également de la concentration de l'enzyme qui a été étudiée sont observés entre la fin de la phase de croissance et la fin de la phase de stress (**Figure 3.5**); avec une augmentation de la concentration de l'enzyme également GST (Glutathion S-Transférase). Cette enzyme est impliquée dans les processus de stress, ce qui explique son augmentation durant le processus de la caroténogénèse durant notre étude. Vu le volume limité des cultures de stress, le temps considérable pour répéter l'ensemble des cultures et le temps limité également pour terminer cette étude, la répétition des analyses, n'a pas pu être réalisée. Concernant l'étude des variations de mobilité électrophorétique des enzymes Glutamate oxaloacétate transaminase (GOT) et l'alcool déshydrogénase (ADH) par la technique MLEE, aucune bande enzymatique n'a pu être révélée durant cette étude à cause des problèmes de mise au point du protocole pour les cultures algales, la faible concentration des enzymes dans les cultures cellulaires et également des difficultés pour la lyse cellulaire dans les conditions non dénaturantes.

L'évaluation du niveau de stress oxydatif au niveau de la souche *Cyclotella sp.* a été effectuée par la détermination du niveau de la peroxydation des lipides membranaires (les acides gras polyinsaturés), elle a été réalisée par le dosage du Malondialdéhyde (MDA) qui est un marqueur biologique des dommages oxydatifs au niveau des lipides engendrés par la

production des radicaux libres au niveau des cellules stressés, par conséquent, l'augmentation de la concentration de ce produit indique que les cellules microalgales sont dans un état de stress, donc le dosage du Malondialdehyde permet d'estimer le niveau de stress oxydatif dans les cellules microalgales.

Conclusion

Conclusion générale

Dans notre étude, une mise au point d'un bioprocédé qui a été utilisé pour la culture de la souche de *Cyclotella* sp. dans des conditions contrôlées de culture. Le processus de la caroténogénèse a été induit sous une combinaison de stress ; un stress nutritionnel (carence de nitrate), un stress lumineux (l'intensité lumineuse a été doublée) et un stress salin représenté par l'ajout du 7.5 g.L^{-1} NaCl. La combinaison de stress utilisé dans notre étude a eu une grande influence sur l'état morphologique et physiologique des cultures algales, avec une augmentation de la teneur en lipide, le poids sec et la teneur des caroténoïdes secondaires. Ces changements ont été également accompagnés par des changements de la teneur des protéines et des enzymes, spécifiquement les enzymes antioxydants, qui ont un rôle de protection dans de telles conditions de stress. Des études sur les changements des enzymes antioxydants seront très importantes pour bien comprendre la corrélation avec le processus de la caroténogénèse, et l'application de ces types de stress est dans le but de maximiser la production des pigments de grande valeur (les caroténoïdes secondaires).

Références bibliographiques

- Abert Vian, M., DejoyeTanzi, C., Chemat, F. 2013. Techniques conventionnelles et innovantes, et solvants alternatifs pour l'extraction des lipides de micro-organismes. EDP. Sciences ou OCL. 20(6) : 2-6.
- Aburai, N., Sumida, D., Abe, K. 2015. Effect of light level and salinity on the composition and accumulation of free and ester-type carotenoids in the aerial microalga *Scenedesmus sp.* (*Chlorophyceae*). Algal Research. 8 : 30-36.
- Alyabyev, A. J., Loseva, N. L., Gordon, L. K., Andreyeva, I. N., Rachimova, G. G., Tribunskih, V. I., Ponomareva, A. A., Kemp, R. B. 2007. The effect of changes in salinity on the energy yielding processes of *Chlorella vulgaris* and *Dunaliellamaritimacells*. Thermochimica. Acta. 458: 65-70.
- Barra, L., Chandrasekaran, R., Corato, F., Brunet, C., 2014. The challenge of Ecophysiological Biodiversity for Biotechnological Applications of Marine microalgae. Mar. Drugs. 12 : 1641-1675.
- Barsanti L., Coltelli P., Evangelista V., Frassanito A. M., Passarelli V., Vesentini N., Gualtieri P. 2008. Oddities and curiosities in the algal world, In: Evangelista V, Barsanti L, Frassanito AM, Passarelli V, Gualtieri P (Eds.), Algal toxins: nature, occurrence, effect and detection, Springer, Dordrecht. pp. 353–391
- Belkoura, M., Benider, A., Dauta, A., 1997. Influence de la température, de l'intensité lumineuse et du stade de croissance sur la composition biochimique de *Chlorellasorokiniana* Shihira & Krauss. *Annls Limnol.* 33 (1): 3-11.
- Ben-Amotz, A., Avron, M., 1983. On the Factors Which Determine Massive β -Carotene Accumulation in the Halotolerant Alga *Dunaliellabardawil*. *Plante Physiol.* 72 (3): 593–597.
- Borowitzka, M. A. 2013. High-value products from microalgae their development and commercialization. *Appl. Phycol.* 25: 743–756.
- Botella-Pavía, P., Rodríguez-Concepción, M. Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. *Physiol. Plant.* 2006. 126 : 369–381.
- Bouarab, L., Loudiki, M., Dauta, A., 2002. Croissance en autotrophie et en mixotrophie de la micro-algue *Micractinium pusillum* Fres. Isolée d'un lagunage naturel : influence de la lumière et de la température. *Water Science.* 15 (1): 73-86.
- Boussiba, S. 2000. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. *Physiol. Plant.* 108: 111-117.
- Boussiba, S., Vonshak, A. 1991. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Cell Physiol.* 32: 1077-1082.

- Bradford, M. M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- Cassidy, K. O. 2011. Evaluating Algal Growth at Different Temperatures. Theses and Dissertations--Biosystems and Agricultural Engineering. Paper 3. 18.
http://uknowledge.uky.edu/bae_et_ds/3
- Cadoret, J. P., Bernard, O. 2008. La production de biocarburant lipidique avec des microalgues : promesses et défis. *Société de Biologie*. 202 (3): 201-211.
- Cazzonelli, C.I. 2011. Carotenoids in nature: insights from plants and beyond. *Functional Plant Biology*. 38(11): 833-847.
- Çelekli, A., Dönmez, G. 2006. Effect of pH, light intensity, salt and nitrogen concentrations on growth and β -carotene accumulation by a new isolate of *Dunaliella* sp. *Microbiology and Biotechnology*. 22(2): 819-826.
- Çelekli, A., Yavuzatmaca, M., Bozkurt, H. 2009. Modeling of biomass production by *Spirulina platensis* as function of phosphate concentrations and pH regimes. *Bioresource Technology*. 100 (14): 3625–3629.
- Coesel, S. N., Baumgartner, A.C., Teles, L. M., Ramos, A. A., Henriques, N. M., Cancela, L., Varela, J. C. S. 2008. Nutrient limitation is the main regulatory factor for carotenoid accumulation and for *Psy* and *Pds* steady state transcript levels in *Dunaliella salina* (Chlorophyta) exposed to high light and salt stress. *Mar. Biotechnol.* 10: 602-611.
- Chader, S., Touzi, A. 2001. Biomasse Algale : Source Énergétique et alimentaire. *Rev. Energ. Ren. : Production et Valorisation- Biomasse*. 47-50.
- Chabrol, E., Castellano, A., 1961. SVP method for estimation of total serum lipid. *Lab. Clin. Med.* 57: 300.
- Cho, S. H., Ji, S. C., Hur, S. B., Bae, J., Park, I. S., Song, Y. C. 2007. Optimum temperature and salinity conditions for growth of green algae *Chlorella ellipsoidea* and *Nannochloris oculata*. *Fish Sci.* 73:1050–1056.
- Cuellar- Bermudez, S. P., Aguilar-Hernandez, I., Cardenas-Chavez, D. L., Ornelas-Soto, N., A-Ogawa, M. R., Parra-Saldivar, R. 2015. Extraction and purification of high aluemetabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. *Microb. Biotechnol.* 8(2): 190-209.
- Defraigne, J., Pincemail, J. 2008. Stress oxydant et antioxydants: mythes et réalités. *Revue médicale de Liège*. 63:10-19.

- Del Campo, J. A., González, M. G., Guerrero., M.G. 2007. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 74:1163–1174.
- Doucha, J., Lívanský, K. 2006. Productivity, CO₂ /O₂ exchange and hydraulics in outdoor open high density microalgal (*Chlorella* sp.) photobioreactors operated in a Middle and Southern European climate. *Applied Phycology.* 18(6): 811-826.
- Dere, E., Yildiz, G., Dalkiran, N., Karacaodlu, D., Dere, S. 2007. Changes in Glutathione S-Transferase Enzyme Activity in *Ulva rigida* According to Abiotic Factors and Locations. *Ekoloji.* 16(64): 1-8.
- Eonseon, J., Polle, J.W., Lee, H. K., Hyun, S. M., Chang, M. 2003. Xanthophylls in Microalgae: From Biosynthesis to Biotechnological Mass Production and Application. *Microbiol.Biotechnol.* 13(2): 165–174.
- Fiedor, J., Burda, K. 2014. Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease. *Nutrients.*6: 466-488.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Biol. Chem.* 226: 497-509.
- Gaël, B., Bruno, S. J. 2014. Microalgues : de petits végétaux aux grandes promesses. *Biofutur.*360 : 28-31.
- Gerloff-Elias, A., Barua, D., Mölich, A., Spijkerman, E. 2006. Temperature and pH-dependent accumulation of heat-shock proteins in the acidophilic green alga *Chlamydomonas acidophila*. *FEMS.Microbiol. Ecol.* 56: 345-354.
- Gerloff-Elias, A., Spijkerman, E., Proschold, T. 2005. Effect of external pH on the growth, photosynthesis and photosynthetic electron transport of *Chlamydomonas acidophila* Negoro, isolated from an extremely acidic lake (pH 2.6). *Plant, Cell and Environment* . 28: 1218-1229.
- Gómez-García, M. d. R., Ochoa-Alejo, N. 2013. Biochemistry and Molecular Biology of Carotenoid Biosynthesis in Chili Peppers (*Capsicum* spp.). *Int. J. Mol. Sci.*14: 19025-19053.
- Grama, B. S., Chader, S., Khelifi, D., Agathos, S. N., Jeffryes, C. 2014. Induction of canthaxanthin production in a *Dactylococcus* microalga isolated from the Algerian Sahara. *Bioresource Technology.* 151: 297–305.
- Grama, B.S., Delhaye, A., Chader, S., Khelifi, D., Agathos, S. N., Jeffryes, C. 2014. Canthaxanthin, Astaxanthin and Adonixanthin Production From a *Dactylococcus* Microalga in a New Flat Plate Airlift Photobioreactor. *Comm. Appl. Biol. Sci.* 79: 1-6.
- Guckert, J. B., Cooksey, K. E. 1990. Triglyceride Accumulation and Fatty Acid Profile Change in *Chlorella* (Chlorophyta) During High pH-Induced Cell Cycle Inhibition. *Phycology.* 26(1): 72-79.

- Guedes, A. C., Amaro, H. M., Malcata, F. X. 2011. Microalgae as Sources of Carotenoids. *Mar. Drugs*.9: 625-644.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., Jakoby, A. B. 1974. Glutathione S-Transferases The First Enzymatic Step In Mercapturic Acid Formation. *Op. Broma. Cn.Chmestry*. 249(22), 7130-7139.
- Halliwell, B. 1996. Antioxidants in human health and disease. *Annu. Rev. Nutr.* 16: 33-50.
- Han, D., Li, Y., Hu, Q. 2013. Astaxanthin in microalgae: pathways, functions and biotechnological implications. *Algae*. 28(2): 131-147.
- Khalil, Z. I., Asker, M. M. S., El-Sayed, S., Kobbia, I. A. 2010. Effect of pH on growth and biochemical responses of *Dunaliellabardawil* and *Chlorella ellipsoidea*. *Microbiol. Biotechnol.* 26: 1225–1231.
- Krzemińska, I., Pawlik-Skowrońska, B., Trzcńska, M., Tys, J. 2014. Influence of photoperiods on the growth rate and biomass productivity of green microalgae. *Biosyst. Eng.* 37(4): 735–741.
- Ledford, K. H., Niyogi, K. K., 2005. Singlet oxygen and photo-oxidative stress management in plants and algae. *Plant, Cell and Environment*. 28(8): 1037–1045.
- Lex de Boer. 2014. Biotechnological Production of Colorants. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 143: 51–89.
- Leya, T., Rahn, A., Lutz, C., Remias, D. 2009. Response of arctic snow and permafrost algae to high light and nitrogen stress by changes in pigment composition and applied aspects for biotechnology. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 67: 432–443.
- Mallick, N., Mohn, F. H. 2000. Reactive oxygen species: response of algal cells. *Plant Physiol.* 157: 183-193.
- Massart, A., Aubry, É., Hantson, A. L. 2010. Étude de stratégies de culture de *Dunaliellatertiolecta* combinant haute densité cellulaire et accumulation de lipides en vue de produire du biodiesel. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 14(2): 567-572.
- Ogbonda, K. H., Aminigo, R. E., Abu, G. O. 2007. Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina sp.* *Bioresource Technology*. 98 (11): 2207-2211.
- Oliveira, M.A.C.L. de., Monteiro, M.P.C., Robbs, P.G., Leite, S.G.F. 1999. Growth and Chemical Composition of *Spirulina Maxima* and *Spirulina Platensis* Biomass at Different Temperatures. *Aquaculture International*. 7(4): 261-275.
- OuldBellahcen, T., Bouchebchoub, A., Massoui, M., El Yachioui, M., 2013. Culture et production de *Spirulina Platensis* dans les eaux usées domestiques. *Larhyss Journal*. 14: 107-122.
- Person, J. 2011. Livre Turquoise - Algues, filière du futur. Éd. Adebitech.

- Pulz, O., Gross, W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65: 635–648.
- Quinn, P.J., Williams, W.P. 1983. The structural role of lipids in photosynthetic membrane. *Biochimica et Biophysica Acta. (BBA) - Reviews on Biomembranes.* 737(2): 223-266.
- Renaud, S. M., Zhou, H. C., Parry, D. L., Thinh, L. V., Woo, K. C. 1995. Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgae *Isochrysis* sp., *Nitzschia closterium*, *Nitzschia paleacea*, and commercial species *Isochrysis* sp. (clone T.ISO). *Applied Phycology.* 7(6): 595-602.
- Rice, E.W., Baird, R.B., Eaton, A.D., Clesceri, L.S. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. American Water Works Association, Washington D.C.
- Rijssel, M. V., Gieskes, W.G. C. 2002. Temperature, light, and the dimethylsulfoniopropionate (DMSP) content of *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae). *Sea Research.* 48(1): 17–27.
- Selander, R. K., Caugant, D. A., Ochman, H., Musser, J. M., Gilmour, M. N., Whittam, T. S. 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* 51 (5) : 873-884.
- Sialive, B., Steyer, J. P. 2013. Les microalgues, promesses et défis. *Innovations Agronomiques.* 26 : 25-39.
- Skjånes, K., Rebours, C., Lindblad, P. 2013. Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. *Critical Reviews in Biotechnology.* 33(2): 172–215.
- Solovchenko, A. E. 2013. Physiology and Adaptive Significance of Secondary Carotenogenesis in Green Microalgae. *Russian Journal of Plant Physiology.* 60(1): 1–13.
- Stirbet, A., Govindjee. 2011. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 104(1-2): 236-257.
- Tomaselli, L., Giovannetti, L., Sacchi, A., Bocci, F. 1988. Effects of temperature on growth and biochemical composition in *Spirulina platensis* strain M2. *Algal biotechnology.* 305-314.
- Thompson, P. A., Harrison, P. J. 1992. Effects of monospecific algal diets of varying biochemical composition on the growth and survival of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae. *Marine Biology.* 113(4): 645-654.
- Takaichi, S. 2011. Carotenoids in Algae: Distributions, Biosyntheses and Functions. *Mar. Drugs.* 9: 1101-1118.

Tyystjärvi, E. 2008. Photoinhibition of Photosystem II and photodamage of the oxygen evolving manganese cluster. *Coord. Chem. Rev.*252: 361-376.

Varshney, p., Paulina Mikulic, P., Vonshak, A., Beardall, J., Wangikar, P. P. 2015. Extremophilic micro-algae and their potential contribution in biotechnology. *Bioresource Technology.* 184: 363–372.

Vílchez, C., Forján, E., Cuaresma, M., Bédmar, F., Garbayo, I., Vega, J. M., 2011. Marine Carotenoids: Biological Functions and Commercial Applications. *Mar. Drugs.* 9: 319-333.
Vincent, M. 1988. Rôles et transformations des pigments caroténoïdes dans les réseaux trophiques marins. *La mer.* 26: 139-147.

Wijffels, R. H., Kruse, O., Hellingwerf, K. J. 2013. Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae. *Current Opinion in Biotechnology.* 24(3): 405-413.

Yao, C. H., Ai, J. N., Cao, X. P., Xue, S. 2013. Salinity manipulation as an effective method for enhanced starch production in the marine microalga *Tetraselmis subcordiformis*. *Bioresource Technology.* 146: 663-671.

Zhekisheva, M., Zarka, A., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z., Boussiba, S. 2005. Inhibition of astaxanthin synthesis under high irradiance does not abolish triacylglycerol accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Phycol.*41: 819–826.

Annexe

Annexe 1

Compositions du milieu de culture 3N-BBM+V modifié (Bold Basal Medium with 3-fold Nitrogen and Vitamins). (Collection de la culture d'algues et de protozoaires, <http://www.ccap.ac.uk/>).

Solution stock en g / 1000 ml d'H₂O pour un volume final de 1L de milieu de culture

- (1) 25.0 g NaNO₃ 30.0 ml
- (2) 2.5 g CaCl₂.2H₂O 10.0 ml
- (3) 7.5 g MgSO₄.7H₂O 10.0 ml
- (4) 7.5 g K₂HPO₄.3H₂O 10.0 ml
- (5) 17.5 g KH₂PO₄ 10.0 ml
- (6) 2.5 g NaCl 10.0 ml
- (7) Solution de trace élément 6.0 ml
- (8) vitamine B1 1.0 ml

Compléter à 1 L avec l'eau distillée.

Solution de traces éléments(7)

Ajouter à 1000 ml d'eau distillée 0.75 g de Na₂ et EDTA:

- FeCl₃.6H₂O 97.0 mg
- MnCl₂.4H₂O 41.0 mg
- ZnCl₂.6H₂O 5.0 mg
- CoCl₂.6H₂O 2.0 mg
- Na₂MoO₄.2H₂O 4.0 mg

Vitamin B1 (8)

0.12 g Thiaminhydrochloride en 100 ml d'eau distillée.

Annexe 2

1. Dosage des protéines

1.1. Courbe d'étalonnage des protéines

Le dosage des protéines est fait selon la méthode de Lowry et al., 1951 modifiée par Pelmont, 1995. La courbe d'étalonnage est réalisée par la BSA (Sérum Albumine Bovine) avec des concentrations de 200 à 1000 µg/ml.

Solution A : Carbonate de sodium (2%) dans le NaOH 0,1N.

Solution B : Sulfate de cuivre (0,5%) préparé dans l'eau distillée.

Solution C : Tartrate double de sodium et de potassium (1%) préparé dans l'eau distillée.

Solution M : préparée à partir de 100 µl de B, 100 µl de C et 10 ml de solution A.

Préparez une série de dilution de la BSA de 200 à 1000 µg/ml dans l'eau distillée puis ajouter la solution M selon le tableau ci-dessous.

Tableau : Méthode de dosage de la BSA.

	B	1/5	2/5	3/5	4/5	5/5	
BSA (µl)	0	40	80	120	160	200	
Eau distillée (µl)		200	160	120	80	40	0
Solution M (ml)		2	2	2	2	2	2

Ajouter 200 µl du réactif de folin dilué à 1/2 par le NaOH 0,1 N.

Laisser 30 min à l'obscurité puis lire à 700 nm (modifiée).

2. Dosage des activités enzymatiques

2.1. Extrait brut des enzymes

0,5g de la matière fraîche est broyée sous l'azote liquide. La solution d'extraction ajoutée contient : tampon phosphate 50 mM, pH : 7,6, 1% pvpp, 1mM EDTA et 0,1% de triton X 100

2.2. Dosage de la glutathion s transférase

Le dosage de la glutathion s-transférase est effectué selon la méthode de HABIG *et al.*, 1974 et SIMONS *et al.*, 1977.

2.2.1. Préparation des solutions :

Tampon phosphate 0,1 M, pH 6,5.

GSH 50 mM pH 6,5.

CDNB 30 mM.

2.2.2. Méthode de dosage

2,7 ml du tampon phosphate et 2,8 ml pour le blanc.

0,1 ml du glutathion.

0,1 ml du CDNB.

Lire l'absorbance à 340 nm chaque minute dans un intervalle de temps de 5 min du blanc et du test.

Calculs :

$$\text{Unités/ml enzyme} = (\Delta A_{340}/\text{mn Test} - \Delta A_{340}/\text{mn Blanc}) (3) (df) / (9,6) * (0,1)$$

3 : volume total (ml)

9,6 : coefficients d'extinction du CDNB conjugué.

0,1 volume de l'extrait enzymatique (ml).

$$\text{Unités /mg de protéines} = \text{Unités/ml enzyme} / \text{mg de protéines/ml d'enzymes.}$$

Une unité correspond la conjugaison de 1 μ mole de CDNB avec le glutathion par minute à pH 6,5.

3. Dosage du MDA

0,5 ml d'extrait

0,5 ml TBA (1%)

1 ml TCA (10%)

Incubation au bain mari (95° pendant 30 min)

Refroidissement des tubes (bain de glace)

Centrifugation pendant 15 min (à 10 000g)

Lecture de l'absorbance à 535 et à 600 nm.

Annexe 3

Protocole de l'électrophorèse des protéines SDS-PAGE

Le protocole expérimental est basé sur des techniques décrites par Laemmli (1970).

1. Préparation des extraits protéiques :

Une aliquote de 100 μ l de chaque culture algale est centrifugée à une vitesse de 5000g pendant 5 min et le culot mis en suspension dans 50 μ l de tampon d'extraction et soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12% en conditions dénaturantes.

1.1 Préparation du tampon d'échantillon (tampon d'extraction) :

- Tris 25 mM
- Glycérol 192 mM
- SDS 2,5%
- β -mercaptoéthanol 2,5%
- Bleu de Bromophénol 5 mg
- Eau distillée 200 ml

Dans la préparation des échantillons après addition du SDS et β -mercaptoéthanol, la solution est portée au bain-marie bouillant 5 min pour une dénaturation complète des protéines. Ce traitement est nécessaire pour la rupture des ponts disulfure.

2. Préparation des solutions stocks (Solutions mères)

2.1 Solution d'acrylamide

- Acrylamide 30% 60g
- Bis acrylamide 0,8% 1,6g
- Eau distillée QSP 200 ml

2.2 Tampon du gel de séparation (resolving gel buffer) : Tris-HCl 3M pH 8,8

- Tris 3M 72,7g
- SDS 0,8% 1,6g
- Mercaptoéthanol (MCE) 0,8 ml
- Eau distillée QSP 200 ml
- Ajuster à pH 8,8 avec HCl.

2.3 Tampon du gel de concentration (stacking gel buffer) : Tris-HCl 0,5M pH 6,8

- Tris 0,5M 12,1g
- SDS 0,4% 0,8g

- MCE 0,2% 400 μ l
- Eau distillée QSP 200 ml
- Ajuster à pH 6,8 avec du HCl

3. Préparation des gels

3.1 Préparation du gel de séparation à 12%

- Solution d'acrylamide 10,4 ml
- Tampon de séparation 3,14 ml
- Tetraméthylènediamide (TEMED) 12,5 μ l
- Eau distillée QSP 25 ml

3.2 Préparation du gel de concentration à 7,5%

- Solution d'acrylamide 5 ml
- Tampon de concentration 5 ml
- TEMED 20 μ l
- Eau distillée QSP 20 ml

Juste avant de couler chaque gel ajouter du persulfate d'ammonium (ammoniumperoxodisulfate) 15%. Préparer 0,15g de persulfate dans 1ml d'eau distillée et ajouter au :

- Gel de séparation 140 μ l
- Gel de concentration 200 μ l

4. Préparation du tampon de migration (running buffer)

- Tris 0,025 M 1,06g
- Glycine 0,192M 5,04g
- SDS 0,1% 0,35g
- MCE 0,05% 175 μ l
- Eau distillée QSP 350 ml

5. Préparation des plaques de gel

Les plaques, espaceurs et peignes sont lavées, rincer ensuite à l'eau puis par l'éthanol.

Faire le montage des plaques en évitant d'avoir des fuites, la solution du gel de séparation est coulée entre les plaques de verre en laissant une hauteur de 4cm pour le second gel.

Eviter la formation des bulles d'air ; avec une pipette niveler le gel avec une solution de butanol. Le gel de séparation va se polymériser généralement après 30 à 35 min. On retire le butanol et on rince délicatement à l'eau distillée.

Le gel de concentration est coulé ensuite. Les peignes sont rapidement insérés de manière inclinée ce qui évitera la formation des bulles d'air.

Le gel se polymérise généralement après 20 min, on retire ensuite les peignes très lentement. Enfin, remplir les puits avec la solution du tampon de migration

6. La migration électrophorétique

Après la réalisation des dépôts, insérer le support positif dans la cuve à électrophorèse. S'assurer que le support est correctement bloqué dans les ergots de guidage. Verser le tampon dans la cuve d'électrophorèse (dans les deux chambres). Fermer la cuve à électrophorèse avec le couvercle porte-électrodes. S'assurer du bon verrouillage du couvercle. Raccorder les électrodes au générateur, puis mettre en service. Choisir le mode manuel sur le générateur et régler les conditions de migrations (on réalise les conditions de migration de jour : c'est-à-dire le voltage est maximal et l'ampérage 40 à 50 A.

Un volume de 50 µl de chaque échantillon protéique est déposé dans chaque puits. Après le dépôt, la migration est réalisée en appliquant un ampérage constant.

La migration dure environ 5h, la fin de la migration est indiquée par l'arrivée du front de migration (bleu de bromophénol) à 3-4mm de l'extrémité du gel.

Couper le générateur, récupérer le tampon dans le flacon d'origine, démouler la plaque, avec une spatule, en prenant beaucoup de précautions pour ne pas casser le gel. On oriente enfin le gel par une encoche par rapport aux dépôts, et le placer dans un petit bac en plastique.

7. La révélation des bandes protéiques

La solution de coloration

- Solution mère (bleu de comassie et de méthanol) 25 ml.
- Acide trichloracétique (TCA) 60% 40 ml.
- Eau distillée QSP 200 ml.

Mettre le gel dans 200ml de solution de coloration pour une nuit avec une légère agitation.

La décoloration est effectuée en remplaçant la solution de coloration par l'eau distillée jusqu'à la décoloration complète du gel et l'apparition des bandes protéiques.

Annexe 4

Le protocole expérimental est basé sur des techniques décrites par (Selander *et al.*, 1986).

1. Préparations des extraits enzymatiques

Les cultures algales sont centrifugées 5000g pendant 10 min à 4°C. Le culot est rincé avec une solution tampon TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) et repris par 1ml dans un tube Eppendorf. La lyse des cellules est obtenue par l'utilisation d'un détergent non dénaturant le Tween-20. Ce dernier est ajouté aux extraits, puis laisser une nuit entière à 4°C. Le lendemain, les extraits sont centrifugés à 14 000g pendant 20 min à 4°C. 100 µl de chaque surnageant est repris dans un tube Eppendorf.

2. Préparation des gels

Un système discontinu a été utilisé, les concentrations des gels utilisés pour l' SDS-PAGE sont appliquées avec modification (absence de SDS).

3. La coloration

Glutamate oxaloacétate transaminase (GOT)

- Acide aspartique 250 mg
- Acide alpha-cétoglutarique 100 mg
- Tris-HCl 0,5 M pH 7,2 50 ml
- H₂O q.s.p. 100 ml

Rinçage après 15 min d'incubation puis ajouter :

- Fast blue BB 200 mg
- Tris-HCl 0,5 M pH 7,2 50 ml
- H₂O q.s.p. 100 ml

Incubation à l'obscurité et à 37°C jusqu'à apparition des bandes.

Alcool déshydrogénase (ADH)

- Ethanol 5 ml
- NAD 20 mg/ml 0.5 ml
- MTT 10 mg/ml 1 ml
- PMS 5 mg/ml 1 ml
- Tris-HCl, 0.2 M pH 8.0 100 ml

Incubation à l'obscurité et à 37°C jusqu'à apparition des bandes.

Nom : BOUAOUN / KOUITEN Prénom : KENZA / MERIEM	Date de soutenance :/06/2015
Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master 2 Spécialité : Biochimie/Analyse Protéomique et Santé	
Thème : Modification des fractions protéiques, enzymatiques et lipidiques de la souche <i>Cyclotella sp.</i> durant le processus de la caroténogénèse.	
Résumé : <p>Les micro-algues, sont des organismes microscopiques qui possèdent un grand potentiel pour la production de métabolites secondaires de grande valeur, notamment les caroténoïdes secondaires, qui se caractérisent par une grande activité antioxydante. Dans notre étude, une mise au point d'un bioprocédé qui a été utilisé pour la culture de la souche de <i>Cyclotella sp.</i> dans des conditions contrôlées de culture. Le processus de la caroténogénèse a été induit sous une combinaison de stress ; un stress nutritionnel (carence de nitrate), un stress lumineux (l'intensité lumineuse a été doublée) et un stress salin représenté par l'ajout du 7.5 g.L⁻¹NaCl. La combinaison de stress utilisé dans notre étude a eu une grande influence sur l'induction et également sur l'état morphologique et physiologique des cultures, avec une augmentation de la teneur en lipide, le poids sec et la teneur des caroténoïdes secondaires. Ces changements ont été également accompagnés par des changements de la teneur des protéines et des enzymes, spécifiquement les enzymes antioxydants.</p>	
Mots clés : <i>Cyclotella sp.</i> , caroténoïdes, protéines, enzymes, bioprocédé.	
Laboratoire de Biochimie Génétiques et Biotechnologies Végétales Faculté de Sciences de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri Constantine.	
Jury de soutenance : Président : MR. Khelifi Douadi Prof. Université Frères Mentouri Constantine Rapporteur: MR. Grama Borhane S. MCB. Université L'Arbi Ben M'Hidi Oum El Bouaghie Examinatrice : Melle. Bellil Inés MCB. Université Frères Mentouri Constantine	
Année universitaire 2014/2015	