



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

قسم الكيمياء الحيوية و البيولوجيا الخلوية و الجزيئية
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Moléculaire et Santé

Intitulé :

**Modification protéique et enzymatique de la souche *Acutodesmus sp.*
strain SG-1 durant le processus de la caroténogénèse**

Présenté et soutenu par :

Le: 02 /06/2015

Bouchoucha Abla

Boufes Hadjer

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr. **Khelifi.Douadi**

Pr. UFM Constantine

Rapporteur : Mr. **Grama Borhane Samir**

M.C.B-U. Oum Elbouaghi

Examinatrice : M^{lle} **Bellil Ines**

M.C.B-UFM Constantine

Année universitaire
2014 - 2015

Remerciement

On remercie Dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de **Mr Grama Borhane Samir**, on le remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre *préparation de ce mémoire*.

Nous sommes conscientes de l'honneur que nous a fait **Mr le Professeur Khelifi Douadi** en étant président du jury et **Mlle Bellil Ines**, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nos remerciements s'adressent également à tous nos professeurs pour leurs générosités et la grande patience dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles.

Nos profonds remerciements vont également à toutes les personnes qui nous ont aidées et soutenue de près ou de loin principalement à toute l'équipe du laboratoire de biochimie génétique et biotechnologie végétale (GBBV) surtout, **Imen, Asma**. Et l'équipe du laboratoire de biologie et environnement surtout Dr **Benhamedi Asma**

Dédicace

*A ma chère famille, ma mère Messaouda, mon père
Abderrezak,*

*Mes sœurs Roumaïssa et Aïcha et sa petite norcine.
Mes frères Chérif et Yasser.*

Mes amis.

HADJER

Dédicace

A mes parents : Ahmed et Fatima

A mes sœurs : Chourouk et Warda

A mon frère : Haroun

A mon fiancé : Bilal

A mes amies

Abla

Sommaire

Liste des figures/tableaux	
Introduction	01
1. Les microalgues.....	02
1.2. Caractéristiques de base des microalgues.....	02
1.3. Les microalgues et l'environnement.....	03
1.4. Les différentes applications des microalgues.....	04
1.4.1. Production alimentaire.....	04
1.4.2. Production des molécules à haute valeur ajoutée.....	04
Les caroténoïdes.....	04
Production des Lipides.....	05
1.4.3. Applications environnementales.....	06
1.5. Cultures des microalgues.....	06
1.5.1. Culture en milieu fermé ou photo-bioréacteur.....	07
Les PBR plats.....	09
1.5.2. Les étangs à ciel ouvert de type raceway.....	09
1.6. Les caroténoïdes.....	11
1.6.1. Classification des caroténoïdes.....	12
1.6.2. Rôle des caroténoïdes.....	13
1.7. La caroténogénèse.....	13
2. Matériels et Méthodes	15
2.1. Souche de microalgue étudiée.....	15
2.2. Préparation des cultures.....	16
2.3. Milieux de culture et croissance cellulaire.....	16
2.4. Processus de caroténogénèse.....	17
• 2.4.1. Cultures en phase de croissance.....	17
• 2.4.2. Induction de la phase de caroténogénèse.....	17
2.5. Analyses biochimiques des extraits produits.....	17
• 2.5.1. Analyse des lipides.....	18
• 2.5.2. Analyse des nitrates.....	18
• 2.5.3. Densité des cultures cellulaires.....	19
• 2.5.4. Dosage des protéines et des enzymes.....	19
• 2.5.5. Détermination des profils protéiques par SDS-PAGE.....	19
3. Résultats	20
3.1. Production de biomasse et caractérisation des cellules.....	20
3.2. Production de pigments.....	21
3.3. Production des Lipides.....	22
3.4. La teneur en protéine et des enzymes.....	23
3.5. Profil protéique (SDS-PAGE).....	24
4. Discussion	25
Conclusion	29
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des tableaux/figures

Table 1. Caroténoïdes produits par quelques microalgues (Guedes, 2011).....	05
Figure 1 : Photobioréacteur tubulaire- Université de Wageningen AlgaeParc (Maryline Abert Vian 2013).....	08
Figure 2 : Photobioréacteur tubulaire comportant des capteurs solaires disposés en parallèle (Demirbas et Demirbas, 2010).....	08
Figure 3 : Schéma d'un photobioréacteur plat.....	09
Figure 4 : Raceway - Université de Wageningen AlgaeParc (Maryline Abert Vian, 2013).	10
Figure 5 : Schéma d'une vue de haut d'un étang ouvert (Belkadi, 2009).....	11
Figure 6 : Systèmes de culture en milieu ouvert, Cyanotech corporation (hawai-usa).....	11
Tableau 2 : Classification des caroténoïdes	12
Figure 2.1 : Arbre phylogénétique neighbor-joining (NJ) la position phylogénétique de <i>Acutodesmus</i> sp. souche SG-1 (Grama <i>et al.</i> , 2014).....	15
Figure 2.2 : A) Culture de <i>Acutodesmus</i> sp. souche SG-1 sur boîte de Pétri durant la phase verte. B) Culture de <i>Acutodesmus</i> sp. souche SG-1 dans des tubes à essai. C) Culture de <i>Acutodesmus</i> sp. souche SG-1 dans des bouteilles de verre Duran de 500 mL durant la phase verte.....	16
Figure 3.1: Variation du poids sec cellulaire durant le premier et le dernier jour des phases verte et phase de stress.....	20
Figure 3.2: 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.....	21
Figure 3.3 : A) <i>Acutodesmus</i> sp. strain SG-1 observée au microscope photonique (grossissement x 40) en phase verte. B) <i>Acutodesmus</i> sp. strain SG-1 observée au microscope photonique (grossissement x 40) en phase de stress.....	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.....	22
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 des enzymes MDA et l'enzyme GST (µmole mg ⁻¹) au dernier jour de la phase verte et de la phase de stress.....	23
Figure 3.6 : Profils protéiques des cultures de <i>Acutodesmus</i> sp. strain SG-1 (V : phase verte, O : phase de stress).....	24

Liste des abréviations

ADH	alcool déshydrogénase
ADN	acide désoxyribonucléique
AGC	cycle ascorbate-glutathion
AGPI	acides gras polyinsaturés
ASA	acide ascorbique
ATP	adenosine Triphosphate
CAT	catalase
DHAsA	déshydroascorbate
DMADP	diméthylalyl diphosphate
DMLA	dégénérescence Maculaire Liée à l'Age
DRO	dérivés réactifs de l'oxygène
GOT	glutamate oxaloacétate transaminase
GSH	glutathion
GSSG	disulfure de glutathion
GST	glutathion S-Transferase
ITS	Internal Transcribed Spacer
MDA	malondialdehyde
M.S	matière sèche
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
PBR	photo bioréacteurs
PV	polyvinyl
PVP	polyvinylpyrrolidone
ROS	reactive oxygen species
SDS	dodécylsulfat de sodium
SDS-PAGE	dodécylsulfat de sodium poly –acrylamide gel

	electrophoresis
SOD	Suproxyde dismutase
SPV	sulfo-phospho-vanilline
UV	ultra violet

Introduction

L'environnement naturel représente une immense source d'où l'être humain peut puiser certains produits, certaines molécules de grand intérêt. En étudiant divers organismes de différents règnes, des découvertes surviennent qui s'avèrent tantôt bénéfiques, ou parfois dangereuses, pour notre existence et celle d'autres espèces vivantes (Sirois, 2013).

Au cours des dernières années, l'utilisation de micro-organismes photosynthétiques, comme les microalgues, en sciences de la vie a reçu attentions croissantes en raison de leur intérêt phytométabolique avec différentes structures chimiques et des activités biologiques diverses (Skulberg, 2006). L'utilisation des microalgues pour la consommation humaine comme source d'aliments de santé, les aliments fonctionnels et de grande valeur pour la production de produits biochimiques, tels que les vitamines, la phycocyanine et acides gras polyinsaturés dont les acides gras oméga-3 ont été développées (Richmond et al., 1986).

Étant rapidement renouvelable, la biomasse algale pourrait fournir de nombreux bioproduits pour des applications de nutrition, de cosmétique et dans le domaine énergétique (Sirois, 2013). Les microalgues, en plus ont la capacité de synthétiser, sous certaines conditions, des molécules d'intérêt (caroténoïdes). Ces caroténoïdes font partie intégrante de l'appareil photosynthétique dans les algues et fonctionnent comme pigments accessoires dans le complexe de récolte et en tant qu'agents de protection contre les produits d'oxygène actif (ROS) qui sont formés à partir de photo-oxydation. Ces radicaux d'oxygène peuvent réagir avec des macromolécules et conduire à des dommages cellulaires (Burch, 1990). Dans une étude précédente (Grama *et al.*, 2014), la production des lipides, des caroténoïdes et des acides gras par *Acutodesmus sp.* souche SG-1, une souche isolée du Sahara Algérien, a été caractérisée. La production des lipides a été proportionnelle à l'intensité lumineuse et le caroténoïde secondaire principal a été la canthaxanthine, qui était censé agir comme agent de conservation des lipides. Le profil des acides gras était plus saturé que dans les souches de *Scenedesmus* précédemment caractérisés.

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 *Acutodesmus sp.* strain SG-1 au cours du processus de la caroténogénèse et également de suivre les changements des protéines et des enzymes au cours de ce processus dans le but d'optimiser la production des caroténoïdes secondaires.

Revue bibliographique

1. Les microalgues

Les microalgues sont des algues microscopiques unicellulaires ou pluricellulaires eucaryotes photosynthétiques vivant dans les mers, les océans, les eaux douces et les eaux saumâtres (Rojan et Gouveta, 2011), dont la taille varie du micron à plusieurs centaines de microns (Cadoret et Bernard, 2008). A l'aide de la lumière solaire, le CO₂ est converti en complexes organiques, des composés qui sont ensuite maintenus à l'intérieur ou libérés de la cellule, elles produisent un panel de molécules variées, tels les carbohydrates, protéines, acides aminés essentiels etc... Ces micro-organismes ont une distribution dans le monde entier, et sont bien adaptés pour survivre dans un large spectre de l'environnement ; la chaleur, le froid, la sécheresse, la salinité, la photo-oxydation, anaérobiose, pression osmotique et l'exposition aux UV (Pulz et Richmond, 2004). La plupart des microalgues sont photo autotrophes qui utilisent le CO₂ comme source de carbone et qu'elles tirent leur énergie de la photosynthèse. Cependant, il existe aussi des microalgues hétérotrophes qui sont capables d'utiliser une source de carbone organique pour se développer (Becerra Celis, 2009).

1.2. Caractéristiques de base des microalgues

La majorité des microalgues sont dites photo-autotrophes ou autotrophes. Elles tirent leur énergie de la lumière par photosynthèse et leur principale source nutritive est le CO₂ en solution dans l'eau. Leur relative simplicité et la petitesse de leur taille permettent d'effectuer une photosynthèse très efficace. Elles convertissent ainsi l'énergie lumineuse en lipides et en hydrates de carbone, des formes plus condensées et stables d'énergie. De plus, leur condition aquatique leur donne un accès optimal à l'eau et en particulier aux nutriments comme le CO₂ dissout (Doré-Deschênes, 2009)

Il existe plusieurs espèces microalgales possédant un métabolisme hétérotrophe. Celles-ci se distinguent toutefois de par leurs caractéristiques nutritionnelles et leur capacité à produire des acides gras pouvant servir à la production de biodiesel. On outre que leur milieu naturel, on trouve différentes espèces de microalgues se développant à des profondeurs d'eau bien différentes. Certaines d'entre elles, se trouvant en eau profonde, et donc, éloignées du soleil, ont subi une évolution biochimique permettant d'accroître la variété de leurs pigments afin d'élargir leur spectre d'absorption pour capter les radiations lumineuses nécessaires à la photosynthèse. Ceci explique la diversité des couleurs rencontrées chez les microalgues, qui vont du vert au rouge, en passant par le bleu (Becerra-Celis, 2009)

- Les avantages de la production des métabolites à partir des microalgues

Les microalgues présentent divers avantages dans le domaine de production des métabolites à savoir:

- Leur croissance est rapide et fait d'elles une importante source renouvelable pour l'énergie (Gouveta, 2011).
- Leur conversion photonique est élevée (environ 3 à 8% face à 0,5% pour les végétaux terrestres), ce qui fait un rendement important par (Demirbas, 2010).
- Leur séquestration de CO₂ est élevée (Świątek 2010).
- Elles sont capables de croître dans un milieu aqueux salin, eaux usées ou eaux saumâtre et se nourrissent de l'azote et phosphore qui se trouvent en général dans les eaux polluées

1.3. Les microalgues et l'environnement

L'importance des microalgues dans l'environnement est telle qu'elles sont à l'origine de 40 à 50% de l'oxygène de l'atmosphère, en plus d'être indispensables pour la vie marine.

-En utilisant l'énergie solaire, pour produire de l'oxygène qui s'accumule lentement dans l'atmosphère primitive, riche en CO₂ et en méthane. L'enrichissement en oxygène de l'atmosphère primitive conduisait à la création de la couche d'ozone, qui protège la terre des rayonnements solaires ultraviolets, et provoque des modifications du climat et de la composition de la croûte terrestre. Ces changements ont ainsi permis une colonisation des continents par de nouvelles formes de vie animale, et végétale. (Hu *et al.*, 2008 ; Rodolfi *et al.*, 2009).

Les algues sont les seuls producteurs primaires des océans (71% de la surface terrestre) (Andersen, 2005). Les Bacillariophycinées (Diatomées), microalgues du phytoplancton, seraient responsables du quart de la production photosynthétique mondiale (Jupin et Lamant, 1999). De façon plus générale, les microalgues jouent un rôle dans les cycles biogéochimiques des lacs et des océans. Leur rôle est crucial dans le cycle du carbone, et elles présentent un potentiel élevé pour la séquestration du CO₂ (Cadoret et Bernard, 2008).

1.4. Les différentes applications des microalgues

1.4.1. Production alimentaire

La plus connue dans ce domaine est une microalgue appelée *Arthrospira platensis*, ou *Spiruline*, que l'on trouve comme complément à l'alimentation dans de nombreux pays comme le Japon, l'Inde ou le Mexique (Richmond, 1987).

Le contenu élevé en protéines (entre 12 et 65 % de la matière sèche d'après (Coutteau, 1996) de plusieurs espèces de microalgues est une des principales raisons pour les considérer comme une source non conventionnelle de protéines (Cornet, 1998 ; Fox,1999). Les microalgues représentent aussi une source importante de presque toutes les vitamines essentielles et sont également riches en pigments, ainsi que Leur contenu en lipides varie entre 1 et 70% de la matière sèche (M.S.). qui composés de glycérol, d'acides gras estérifiés, saturés ou non saturés. (Becker, 2004)

1.4.2. Production des molécules à haute valeur ajoutée

Les microalgues constituent une source durable de produits naturels dont plus de 15000 nouveaux composés ont été identifiés (Zhi-gang de Zhou, 2014). Alors que les applications alimentaires proviennent le plus souvent de coutumes ancestrales, la production de molécules à haute valeur ajoutée est beaucoup plus récente. Ces molécules peuvent être extraites lorsque leur concentration est suffisante. La microalgue est alors cultivée pour un élément particulier de sa composition. (Giuliana Becerra-Celis, 2009). Parmi ces molécules on trouve : les caroténoïdes et les lipides.

➤ Les caroténoïdes

En plus de la chlorophylle (0,5 à 1% de la matière sèche), qui est le pigment photosynthétique primaire chez toutes les algues photosynthétiques, on trouve toute une gamme de pigments supplémentaires de type caroténoïdes (0,1 à 0,2% de la M.S.) (Becker, 2004). Les microalgues constituent une source naturelle exceptionnelle de caroténoïdes. Certaines espèces sont capables d'accumuler des teneurs élevées en caroténoïdes en tant que partie de leur biomasse. Un certain nombre de souches d'algues ont été intensivement étudiée en ce qui concerne leurs activités de production de caroténoïdes, comme le β -carotène, la zéaxanthine, la lutéine et l'astaxanthine.

La production des caroténoïdes a été l'une des activités les plus réussies dans la biotechnologie des microalgues avec grand succès commercial réalisé (Zhi-gang, 2014). Exemple de production de β -carotène : le procédé pour la production naturelle de β -carotène a partir d'algue unicellulaire *D. salina* : L'ampleur de accumulation caroténoïde en globules dans l'espace interthylakoidique de leur chloroplaste qui dépend de la salinité élevée, de température élevée de stress, une forte intensité lumineuse, ou carence en azote. Dans ces conditions, jusqu'à 12% poids sec de l'algue est β -carotène (Ben-Amotz 1999)

Table 1. Caroténoïdes produits par quelques microalgues (Guedes, 2011)

Microalga source	Active compound	Reference
<i>Dunaliella salina</i>	β -carotene	(Rabbani <i>et al.</i> , 1998) (Demming-Adams, 2012)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxanthin, cantaxanthin, lutein	(Demming-Adams, 2012).
<i>Chlorella vulgaris</i>	Cantaxanthin, astaxanthin	(Demming-Adams, 2012; Baky, 2011)
<i>Coelastrrella striolata</i> var. <i>Multistriata</i>	Canthaxanthin, astaxanthin, β -carotene	(Abe <i>et al.</i> , 2005)
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	Lutein, β -carotene	(Macías-Sánchez, 2010)

➤ Production des Lipides

Les microalgues ont un avantage sur les espèces oléagineuses terrestres : elles peuvent accumuler jusqu'à 50% de leur poids sec en acides gras, permettant d'envisager des rendements à l'hectare supérieurs aux espèces oléagineuses terrestres. (Certik et Shimizu, 1999 ; Giuliana Becerra-Celis.2009). A l'heure actuelle, les lipides neutres comme les triglycérides et les acides gras libres sont les plus exploités dans l'industrie alimentaire, cosmétique et pharmaceutique. Ces lipides neutres sont obtenus à partir des huiles de poisson. Leur caractéristique principale est la présence des acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI). Les microalgues sont riches en AGPI et présentent l'avantage de ne pas contenir de cholestérol, de ne pas avoir d'odeur et de goût désagréables et d'être cultivables en photobioréacteurs. Elles représentent une alternative intéressante face à la production

d'AGPI à partir des huiles de poisson. Quelques espèces de microalgues comme *Nannochloropsis*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Porphyridium*, *Nitzschia laevis*, *Mortierella*, *Pythium* et *Parietochloris incisa* (Certik et Shimizu, 1999 ; Khozing-Goldberg et al., 2006; Giuliana Becerra-Celis.2009).

1.4.3. Applications environnementales

Les caractéristiques biochimiques et physiologiques des microalgues sont aussi exploitées pour des applications concernant l'environnement : elles se révèlent utiles pour dépolluer les eaux usées, pour capturer et valoriser et pour produire de l'énergie propre comme les biocarburants (Giuliana Becerra-Celis, 2009).

1.5. Cultures des microalgues

La culture des micro-algues à grande échelle peut être conduite selon deux modes, soit à l'aide de bassins ouverts à haut rendement, le raceway ou dans une enceinte transparente fermée utilisant la lumière naturelle ou artificielle, le photo-bioréacteur (Maryline Abert Vian *et al.*, 2013). Les microalgues ayant un métabolisme autotrophe sont principalement cultivées en bassins extérieurs, dans des photobioréacteurs ou encore grâce à des modèles hybrides permettant de conjuguer ces deux premières approches. Plusieurs éléments influencent l'efficacité des méthodes de culture utilisées, dont le choix des microalgues, la localisation et le climat. Pour assurer une efficacité en mode autotrophe, des températures moyennes d'au moins 15 °C doivent être rencontrées, ainsi que des conditions d'ensoleillement optimales. Les microalgues de métabolisme hétérotrophe sont principalement cultivées dans des bioréacteurs fermés appelés fermenteurs en absence de rayonnement solaire. Pour assurer leur croissance, elles doivent être en présence d'un substrat organique.

Il serait possible de croire que celles-ci peuvent utiliser n'importe quelle source d'hydrates de carbone pour remplacer le rayonnement solaire en tant que source d'énergie pour leur métabolisme, alors que tel n'est pas le cas. En effet, certains substrats sont en mesure de supporter la croissance de certaines espèces alors que ces mêmes substrats sont inefficaces pour d'autres espèces. De plus, certains composés chimiquement similaires ne favorisent pas nécessairement la croissance d'une espèce micro algale donnée (Cantin, 2010).

1.5.1. Culture en milieu fermé ou photo-bioréacteur

L'utilisation des photobioréacteurs revient plus chère que les systèmes d'étang à ciel ouvert, cependant ils nécessitent moins de lumière et d'espace pour la culture des microalgues. En effet, il faut établir des conditions d'agitation et de turbulence compatibles avec la biologie des espèces. C'est le cas de certaines cellules qui ont un flagelle particulièrement fragile et qui sont extrêmement sensibles à de fortes contraintes de cisaillements (Cadoret et Bernard, 2008). Deux géométries pour les photobioréacteurs fermés sont préférées pour la production à grande échelle : les réacteurs tubulaires et les réacteurs plats.

➤ Les PBR tubulaires

Les photobioréacteurs tubulaires semblent être les plus satisfaisants de point de vue production de la biomasse algale convertie en biocarburants dont la quantité varie entre 2 et 5 g/l (Becerra Celis, 2009). Le photo-bioréacteur tubulaire est une association de plusieurs tubes transparents en plastique ou en verre. Ils ont habituellement un diamètre de moins de 10 cm afin de permettre à la lumière d'atteindre la majeure partie des cellules en suspension. La source de lumière peut être naturelle ou artificielle. Ce milieu clos et hermétique évite les contaminations extérieures (Pulz, 2001), ils assurent la croissance d'une seule espèce d'algue sans qu'elle rentre en compétition avec une autre espèce et permet la production de biomasse à large échelle. L'injection d'air permet de fournir du carbone sous forme de CO₂, de brasser le milieu et d'évacuer les poches d'oxygène toxique pour les micro-algues. Dans le cas de la lumière naturelle, l'arrangement des tubes se fait souvent du nord vers le sud pour assurer un ensoleillement maximal et parallèle ou horizontal pour que chaque tube puisse recevoir le même taux d'ensoleillement (Sánchez Mirón *et al.*, 1999). La lumière artificielle des PBR est techniquement réalisable mais elle représente un coût important comparé à la lumière naturelle. Le contrôle de la température est un élément important à prendre en compte pour les photo-bioréacteurs. Un système d'échangeur de chaleur est nécessaire pour refroidir le milieu de culture qui est recyclé. Les systèmes fermés permettent d'exploiter une gamme de microalgues plus larges, d'atteindre de meilleurs rendements et de s'affranchir des problèmes de contaminations. Les coûts de production via cette méthode sont cependant beaucoup plus élevés qu'en bassin ouvert. Ce mode de culture est réservé aux micro-algues à hautes valeurs ajoutées (Maryline Abert Vian, 2013) (Fig. 1).



Figure 1 : Photobioréacteur tubulaire- Université de Wageningen AlgaeParc (Maryline Abert Vian 2013).

La Figure 2 montre le milieu de culture provenant de la colonne de dégazage pompé en continu dans les tubes où la lumière est absorbée. Il retourne ensuite dans la colonne de dégazage. Du milieu de culture frais est introduit de façon continue dans la colonne de dégazage pendant la journée et une quantité équivalente du milieu de culture située à l'intérieur du dispositif est extraite du courant qui retourne dans la colonne. En vue de contrôler la température, de l'eau de refroidissement est utilisée. Celle-ci passe par le serpentin d'un échangeur thermique situé dans la colonne de dégazage. Cette dernière est aérée en continu afin d'évacuer l'oxygène accumulé au cours de la photosynthèse. On élimine également le gaz de sortie de la colonne (Demirbas et Demirbas, 2010).

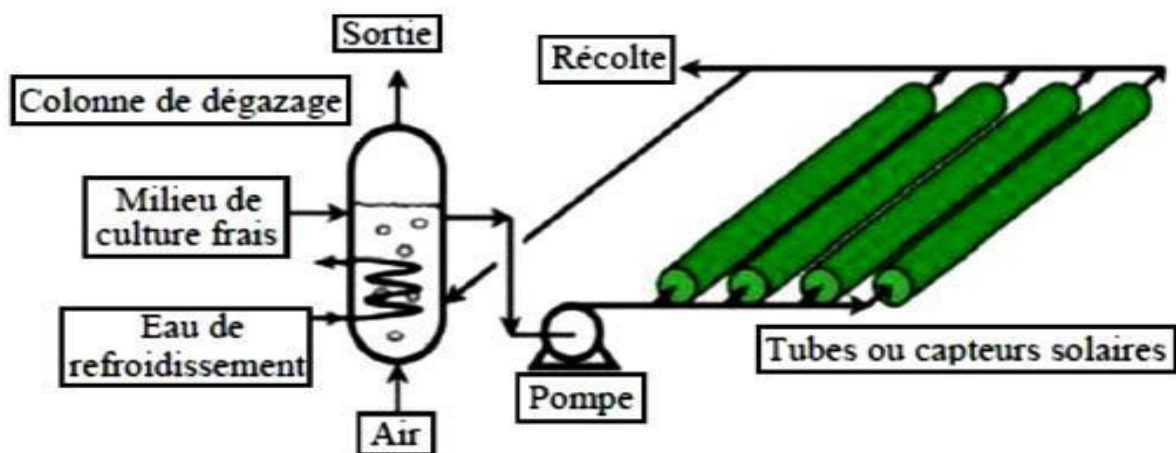


Figure 2 : Photobioréacteur tubulaire comportant des capteurs solaires disposés en parallèle (Demirbas et Demirbas, 2010).

➤ Les PBR plats

Un photobioréacteur plat se compose de deux panneaux parallèles transparents pour laisser passer la lumière, de surfaces variables et entre lesquels réside une mince couche de culture d'une profondeur (épaisseur) de quelques centimètres (Olivio, 2007). PBR plats sont des structures fines (moins de 10cm) et verticales qui offrent de larges surfaces éclairées dont le mixage est réalisé par un barbotage de l'air injecté à la base. Du fait de l'importante surface éclairée et un mixage efficace, les densités cellulaires obtenues sont généralement élevées, c'est-à-dire plus de 80g/l (Brennan et Owende, 2009). Des PBR plats de plus de 1000l ont été testé avec succès ce qui présuppose que cette technique pourrait être intéressante à plus grande échelle (Mata *et al.*, 2010).

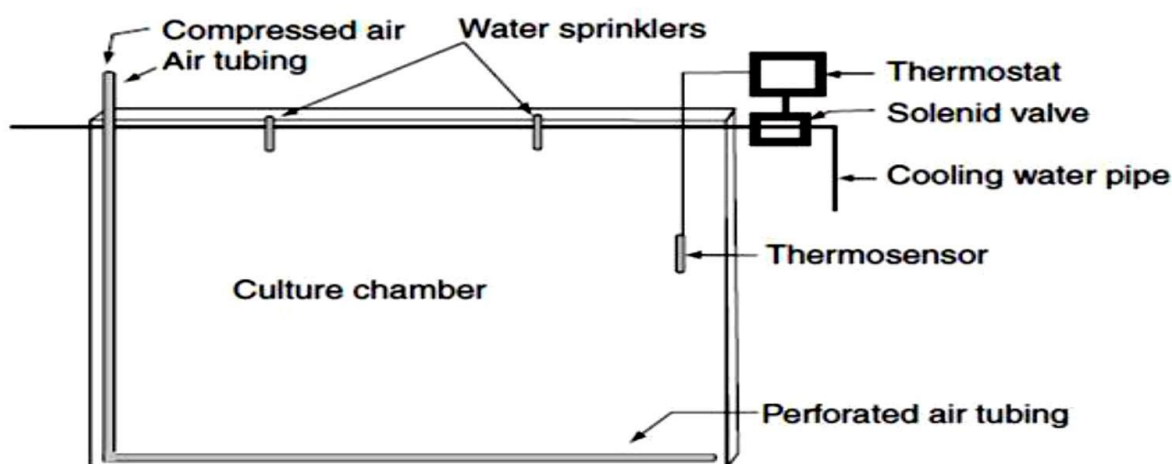


Figure 3 : Schéma d'un photobioréacteur plat.

1.5.2. Les étangs à ciel ouvert de type raceway

Les systèmes de culture en milieu ouvert (bassins, « raceways», cuves), sont des étangs de recirculation en boucle fermée avec une profondeur de quelques dizaines de centimètres, sont des technologies simples et présentant peu d'investissement initial (**Fig. 4**) (Maryline Abert Vian, 2013). Dont les chemins à roulement faits en béton coulé ou sont creusés directement dans le sol et recouverts d'une couche en plastique pour empêcher la pénétration du milieu de culture dans le sol (Demirbas et Demirbas, 2010).

Le mélange et la circulation du milieu sont possibles grâce à une roue à aube et un bullage permet un apport en CO₂. La température du milieu fluctue selon les cycles diurnes (nuit) et saisonniers. Toutefois peu d'espèces de micro-algues peuvent être cultivés en milieu

ouvert de manière mono-spécifique. Pour toute culture en milieu ouvert la principale contrainte est le risque de contamination par d'autres espèces de micro-algues ou d'autres microorganismes comme des bactéries. Les rendements atteints avec ces systèmes ne sont pas optimaux à cause de la difficulté à contrôler les facteurs environnementaux (hauteur de la lame d'eau, échauffement du bassin, phénomènes d'évaporation, etc.). La concentration en biomasse pour ce type de culture est généralement peu élevée car l'agitation du milieu est faible et des zones non agitées peuvent subsister (Maryline Abert Vian, 2013). Ce système est utilisé aux Etats Unis, Japon, Australie, Inde et aussi en Chine, c'est un mode de culture qui revient moins chère, sauf que la contamination est probable, ce qui ne permet pas de réaliser la culture de toutes les espèces. La culture de *Chlorella* est réussite dans les étangs, en revanche, les espèces comme *Spirulina* et *Dunaliella* nécessitent des milieux spécifique, alcalin pour la première et une forte teneur en sel pour la deuxième.



Figure 4 : Raceway - Université de Wageningen AlgaeParc (Maryline Abert Vian, 2013).

La figure 5 est un schéma d'un étang, la profondeur des canaux est d'environ 0,3 m. La roue à aube fonctionne continuellement afin d'empêcher la sédimentation (Demirbas et Demirbas, 2010).

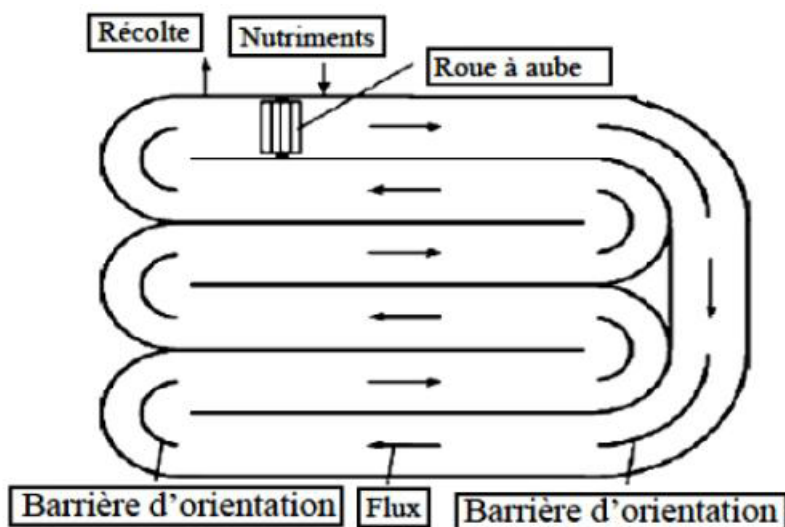


Figure 5 : Schéma d'une vue de haut d'un étang ouvert (Belkadi, 2009).

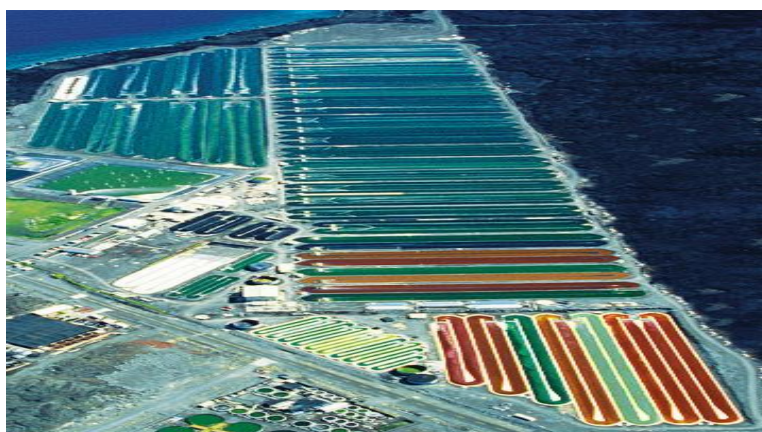


Figure 6 : Systèmes de culture en milieu ouvert, Cyanotech corporation (hawai-usa).

1.6. Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments photosynthétiques d'apparence orangée ou jaune, liposolubles, appartenant à la famille des terpénoïdes, formés à partir de la polymérisation d'unités isopréniques (composés dérivés d'isoprènes), généralement à 40 carbones (Clotault., 2011) à structure aliphatique ou alicyclique. Les caroténoïdes sont en général facilement assimilables par les organismes, ils sont généralement admis qu'ils suivent des voies métaboliques similaires à celles des lipides. Ils sont synthétisés par toutes les algues, toutes les plantes vertes et par de nombreux champignons et bactéries (dont les cyanobactéries) à l'intérieur des plastes. Ils sont contenus dans les chloroplastes et plus

particulièrement au chromoplastes (Karrer et Jucker, 1950). Les caroténoïdes sont des polyènes, c'est-à-dire qu'ils comportent un arrangement linéaire de doubles-liaisons conjuguées.

Présent chez tous les organismes effectuant la photosynthèse oxygénique, le β -carotène est le caroténoïde le plus ubiquitaire, alors que d'autres caroténoïdes comportent des substituant variés (notamment des groupements hydroxyle (-OH) (Sirois, 2013).

1.6.1. Classification des caroténoïdes

En fonction de la présence ou de l'absence d'oxygène dans la molécule, ils peuvent être divisés en: xanthophylles, qui contiennent de l'oxygène, et le carotène, qui manquent d'oxygène (Tazzini, 2013).

Tableau 2 : Classification des caroténoïdes

xanthophylles	carotènes
anthéroxanthine	alfa-carotène (orange)
Astaxanthine (rouge)	bêta-carotène (orange), E160a
Auroxanthin	delta-carotène
Bixine, E160b	gamma-carotène (orange)
Canthaxanthine (rouge), E161g	Le lycopène (rouge), E160d
Capsanthine, E160c	neurosporène
Capsorubine, E160c	Phytoène (incolore)
bêta-carotène-5,6-époxyde	phytofluène
alfa-cryptoxanthine (jaune)	alfa-zéacarotène
bêta-cryptoxanthine (orange)	bêta-zéacarotène
crocétine	zeta-carotène
La lutéine (jaune), E161b	
La lutéine-5,6-époxyde ou taraxanthin	
Luteoxanthin	
Lycophyll	
Lycoxanthin	
néoxanthine	
Rubixanthin	
Tunaxanthin	
Violaxanthine (jaune)	
Zéaxanthine (jaune-orange)	
Zeinoxanthin	

1.6.2. Rôle des caroténoïdes

Chez les algues comme chez les autres végétaux, les caroténoïdes jouent un rôle dans l'absorption de l'énergie lumineuse. Ils assurent la transmission de celle-ci à la chlorophylle et assurent la protection des cellules contre les effets nocifs des rayons ultraviolets, et photoprotection (récupération de l'énergie de la chlorophylle en particulier en cas d'excès de lumière et d'ombre). Les caroténoïdes sont de puissants antioxydants capables de piéger l'oxygène singulet et de désactiver les radicaux peroxydes, formés à partir des acides gras polyinsaturés par l'action de l'oxygène. Les caroténoïdes donc agissent à titre d'agents protecteurs, empêchant la formation dans les Thylacoïdes des espèces réactives de l'oxygène (Brack et Mathis, 2000)

Ils jouent aussi un rôle moins connu, comme précurseurs pour la biosynthèse d'apocaroténoïdes comme l'apocaroténal ou certaines hormones végétales (acide abscissique, strigolactones, etc.) (Brack et Mathis, 2000). En plus leur structure permet de piéger les espèces réactives de l'oxygène, les caroténoïdes sont des éléments nutritifs importants pour l'homme et les animaux puisqu'ils servent de précurseurs à la vitamine A (Armstrong, 1999). En outre, les caroténoïdes seraient également impliqués dans la prévention de certaines maladies. Leur effet bénéfique a été montré dans les maladies de l'œil dont la DMLA (Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age), les maladies cardiovasculaires, certains cancers et l'érythème induit par la lumière. L'action des caroténoïdes dans la prévention de ces maladies serait liée à leur pouvoir anti-oxydant. Enfin les caroténoïdes auraient un rôle dans la régulation du système immunitaire et dans la protection de la stabilité génomique (Fraser et Bramley, 2004).

1.7. La caroténogenèse

La production de caroténoïdes par les organismes photosynthétiques est une réponse physiologique pour contrer les effets délétères du stress oxydatif intracellulaire causé par les dérivés réactifs de l'oxygène (DRO), tels que l'anion radicalaire superoxyde ou le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Stirbet et Govindjee, 2011). Sous des conditions optimales de croissance, Les cellules végétatives de l'algue persistent et l'algue possède des caroténoïdes normalement retrouvés chez les Chlorophytes et dans les chloroplastes des plantes supérieures, soit β -carotène, lutéine, violaxanthine, néoxanthine et zéaxanthine (ensemble

formant les caroténoïdes primaires); or lorsque l'algue est exposée à des conditions environnementales Extrêmes (conditions limitant la croissance), les cellules végétatives commencent à synthétiser des caroténoïdes et à l'accumuler en grande quantité, tout en subissant des Changements au niveau de la morphologie cellulaire résultant en la formation de plus grosses cellules, rouges, nommées aplanospores, résistantes à ces conditions environnementales extrêmes (Harker et al., 1996). La présence d'une grande quantité des caroténoïdes augmente la résistance cellulaire face aux stress oxydatifs générés par les conditions environnementales défavorables, telles une illumination excessive, un stress au niveau de la nutrition et une Irradiation aux rayons UV (Lemoine et Schoefs, 2010). Aussi, l'accumulation de ces pigments constitue un moyen d'entreposer énergie et carbone, qui seront utilisés lorsque les conditions Redeviendront plus favorables (Sirois, 2013).

Matériels et Méthodes

2. Matériels 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 génétique et biotechnologie végétales, université des frères Mentouri (Constantine).

2.1. Souche de microalgue étudiée

Acutodesmus sp. strain SG-1 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 (Grama *et al.*, 2014). Une recherche BLAST a été utilisée pour comparer les similitudes entre la souche isolée et d'autres espèces apparentées. La souche MT1 atteint 99.8% de similarité avec *A. obliquus* souche CCAP 276/2 (numéro d'accès GenBank FR865715), UTEX souche 1450 (AJ249506), la souche CCAP 276/49 (FR865726) et la souche CCAP 279/46 (FR865738), et *Acutodesmus bernardii* souche CCAP 276/38 (JQ082329) (Grama *et al.*, 2014).

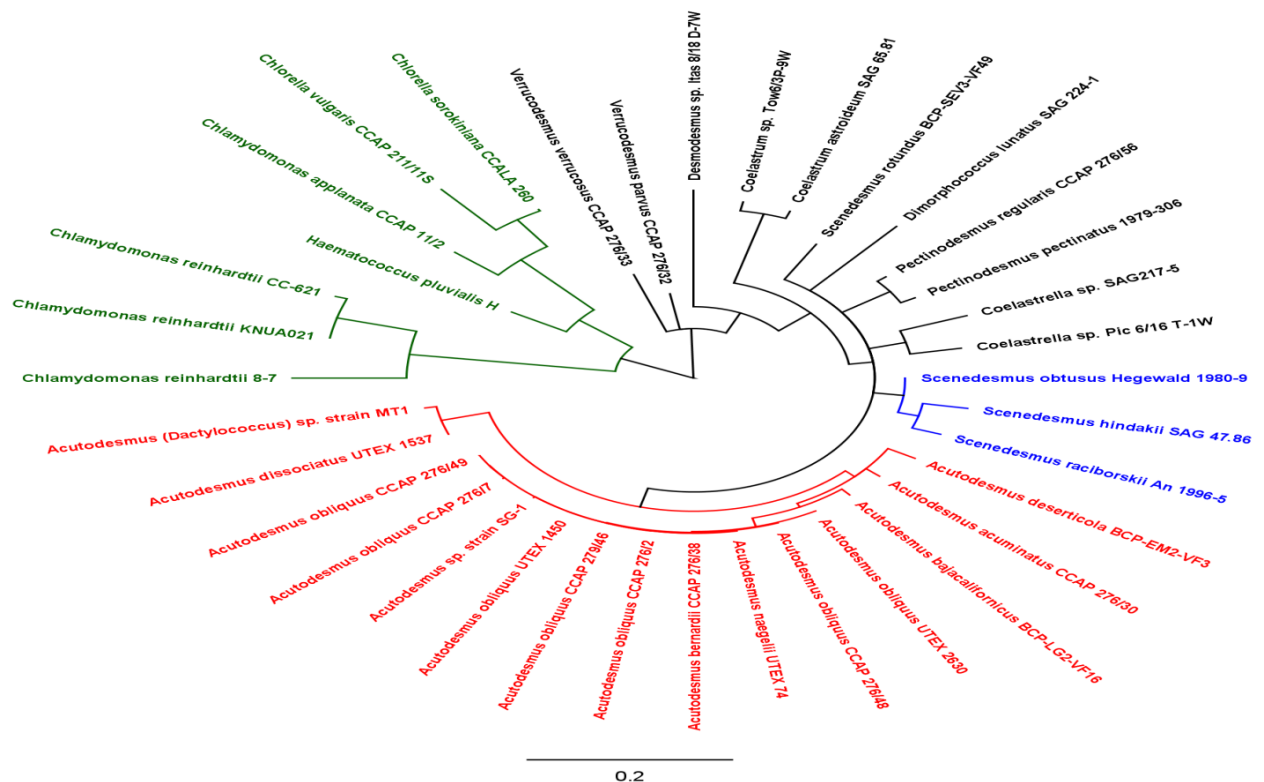


Figure 2.1 : Arbre phylogénétique neighbor-joining (NJ) la position phylogénétique de *Acutodesmus* sp. souche SG-1 (Grama *et al.*, 2014).

2.2. Préparation des cultures

Pour avoir une culture en bon état physiologique de l'algue sélectionnée, il est nécessaire de connaître les conditions optimales pour la microalgues (donner aux microalgues les nutriments nécessaires à leur développement). Toute manipulation concernant la culture, doit être faite en conditions stériles, sous hotte stérile avec flamme et en utilisant des instruments préalablement stérilisés afin d'éviter toute contamination de culture et donc l'obtention d'une culture de meilleure qualité.

2.3. Milieux de culture et croissance cellulaire

La souche étudiée a été maintenue en culture axénique sur milieu solide composé de 3N-BBM+V modifié (Collection de la culture d'algues et de protozoaires, <http://www.ccap.ac.uk/>) additionné de $1,0 \text{ g L}^{-1}$ d'acétate de sodium trihydrate, $2,0 \text{ g L}^{-1}$ BactoTM tryptone, $2,0 \text{ g L}^{-1}$ BactoTM d'extrait de levure et 15 g L^{-1} d'agar. Des repiquages successifs sur milieux solides frais ont été effectués mensuellement. La composition du milieu 3N-BBM+V modifié est donné en annexe (**Annexe 1**). La stérilisation des milieux de culture et l'entretien ont été obtenus par passage à l'autoclave pendant 20 min à $121 \text{ }^\circ\text{C}$ à 1,6 bar.

Les cultures liquides de *Acutodesmus* sp. souche SG-1 ont été préparées en transférant une anse de la culture du milieu solide dans des tubes à essai dans 10 ml. Ces cultures stériles, en milieux liquides ont été utilisées pour inoculer les pré-cultures en phase de croissance.

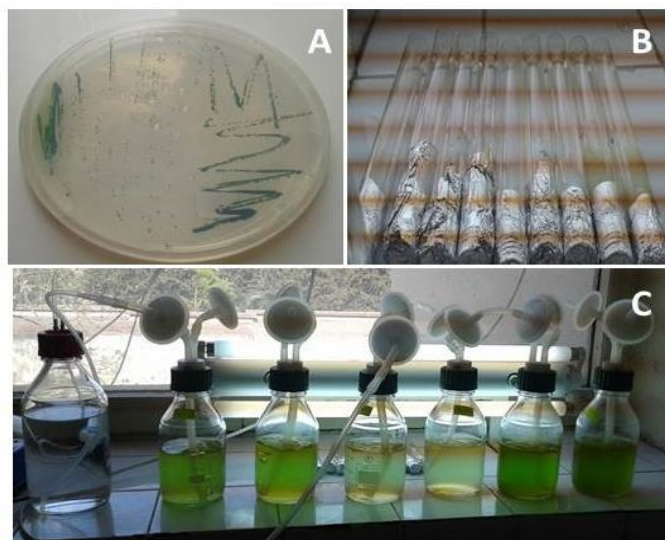


Figure 2.2 : A) Culture de *Acutodesmus* sp. souche SG-1 sur boîte de Pétri durant la phase verte. B) Culture de *Acutodesmus* sp. souche SG-1 dans des tubes à essai. C) Culture de *Acutodesmus* sp. souche SG-1 dans des bouteilles de verre Duran de 500 mL durant la phase verte.

2.4. Processus de caroténogénèse

2.4.1. Cultures en phase de croissance

La phase de croissance de *Acutodesmus* sp. souche SG-1 a été préparée pour fournir de l'inoculum avec le stress en nitrate pour les expériences de caroténogénèse. Ces cultures ont été réalisées dans des bouteilles de verre Duran de 500 ml avec un volume de culture de 450 ml. Les cultures ont été aérées en faisant barboter de l'air filtré à travers un tube de silicone (diamètre : 6 mm). En plus de l'agitation de la culture qui a été apportée par le barbotage de l'air, les cultures ont été agitées manuellement une fois par jours pour l'ensemble des cultures. Les cultures de la phase verte ont été suivies pour une durée de dix jours.

Les cultures ont été cultivées en double sous une température ambiante avec une intensité lumineuse fournie par des lampes blanc froid de 18W (**Figure 2.3**). Lorsque la concentration mesurée de NO_3^- était inférieure à $6.15 \pm 0.13 \text{ mg L}^{-1}$, les cellules vertes ont été utilisées comme inoculum pour les expériences de caroténogénèse. L'analyse des cultures ont été menés au premier et au dernier jour de l'expérience.

2.4.2. Induction de la phase de caroténogénèse

Après la phase de croissance, la phase de stress commence lorsque les microalgues sont transférées dans des bouteilles de verre Duran de 500 ml avec un volume de culture de 450 ml. Pour l'inoculation, 25 mL de cellules en phase de croissance ($< 6.15 \pm 0.13 \text{ mg NO}_3^- \text{ L}^{-1}$) 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. La concentration finale du NaCl dans le milieu été donc de $7,5 \text{ g L}^{-1}$ après mélange avec la culture de cellules. Les cultures ont été cultivées en double et à une température ambiante. L'intensité de lumière a été doublée. Les expériences ont été suivies pour une durée de 14 jours.

2.5. Analyses biochimiques des extraits produits

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

2.5.1. 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 est enlevée et la couche inférieure est 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 200 µl a été mesurée à 525 nm dans un lecteur spectrophotométrique. Chaque mesure a été effectuée en deux exemplaires. 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).

2.5.2. 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. Chaque mesure a été effectuée en double exemplaires.

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 :

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

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

2.5.3. 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 ont été centrifugés 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 centrifugées à nouveau pendant 10 min à 2000g. Les culots ont été lavés deux fois, 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. Les mesures ont été effectuées en double exemplaires.

2.5.4. Dosage des protéines et des enzymes

Les protéines ont été quantifiées par spectrométrie utilisant la méthode de Bradford (Bradford, 1976), suivant les produits chimiques disponibles au niveau du laboratoire, on a choisi pour notre étude : l'enzyme Glutathion S-Transferase (GST) et la Malondialdéhyde (MDA). L'évaluation du niveau de stress oxydatif 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).

2.5.5. Détermination des profils protéiques par SDS-PAGE

La séparation permet généralement de distinguer deux protéines dont les masses respectives diffèrent de 2%. La séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) donne un profil ou électrophorégramme caractéristique de la souche et reproductible si les techniques employées sont standardisées (Ndoye, 2000). Chaque bande d'un profil électrophorétique est composée de plusieurs protéines de structure différente mais de mobilité identique (Ndoye, 2000). 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. A 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 caroténogène a été suivie pendant une période de 14 jours.

3.1. Production de biomasse et caractérisation des cellules

Comme le montre la **Figure 3.1**, au cours de la phase verte ou la phase de croissance cellulaire, le poids sec des cellules a augmenté. Au début de la culture, le poids sec cellulaire a été de $0,2 \pm 0,02 \text{ g.L}^{-1}$, cette densité a augmenté jusqu'à $1,43 \pm 0,11 \text{ g L}^{-1}$, l'augmentation du poids sec a été corrélée avec la consommation et une dégradation cellulaire du nitrate. La concentration de ce dernier a diminué de $12,58 \pm 0,79 \text{ mg L}^{-1}$ jusqu'à $5,90 \pm 0,07 \text{ mg L}^{-1}$ (**Figure 3.2**). Au cours de cette phase le pH de la culture a augmenté de $7,5 \pm 0,02$ jusqu'à $9,05 \pm 0,09$ au 14^{ème} jour de la culture de croissance.

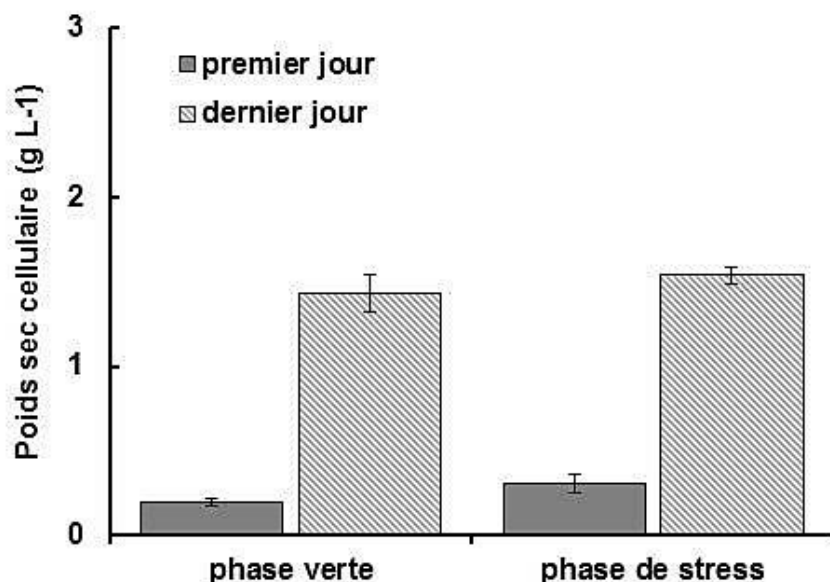


Figure 3.1: Variation du poids sec cellulaire durant le premier et le dernier jour des phases verte et phase de stress.

Comme le montre la **Figure 3.1**, au cours de la phase de stress, le poids sec des cellules a augmenté. Au début du processus de la caroténogène, le poids sec cellulaire été de $0,31 \pm$

0,06 g L⁻¹ cette densité a augmenté jusqu'à 1,67 ± 0,05 g L⁻¹ au 14^{ème} jour de la culture de stress.

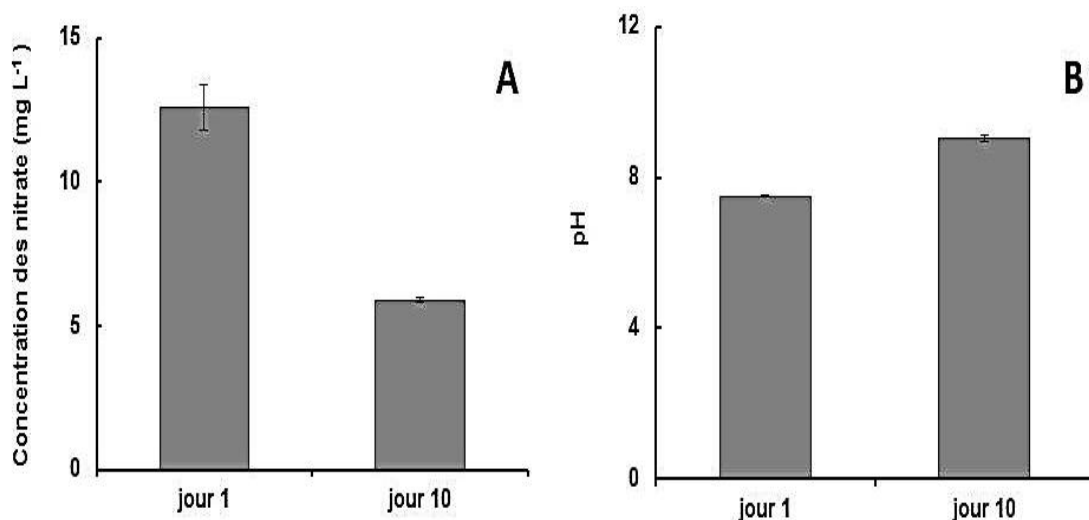


Figure 3.2 : A) Variation de la concentration en nitrate (en mg L⁻¹) au premier et au dernier jour de la phase verte. B) Variation du pH entre le premier et le dernier jour de la phase verte.

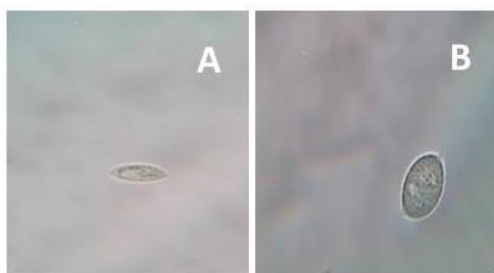
3.2. Production de pigments

Au début de la caroténogénèse, les pigments photosynthétiques y compris la chlorophylle et les caroténoïdes primaires étaient prédominants comme le montre la pigmentation verte des cultures. En se basant sur l'aspect microscopique des cellules, après 12 jours de culture de stress, la teneur total des chlorophylles par cellule a diminué de façon significative pour les cultures d'*Acutodesmus sp.* strain SG-1 (**Figure 3.3**), cette phase a été caractérisé par la biosynthèse des caroténoïdes secondaire, et notamment la canthaxanthine qui a donné la couleur orange à la culture cellulaire.

Dans une études précédente (Grama *et al.* 2014), et sous des conditions de stress similaire, la souche de *Acutodesmus sp.* strain SG-1 a montré une évolution intracellulaire de la canthaxanthine, astaxanthine de culture. La différence de la teneur des pigments entre la phase verte et la phase de stress 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 primaire et secondaire pour notre travail.

Les conditions de stress ont eu une grande influence sur la morphologie, la physiologie et sur la croissance cellulaire. La phase de croissance cellulaire a été caractérisée également par des cellules rondes et vertes de petite taille, l'aspect microscopique a montré que après la phase de stress, les cellules sont devenues grande, avec une pigmentation orange qui est due à la production de pigments secondaire et notamment la canthaxanthine.



2

Figure 3.3 : A) *Acutodesmus sp. strain SG-1* observée au microscope photonique (grossissement x 40) en phase verte. B) *Acutodesmus sp. strain SG-1* observée au microscope photonique (grossissement x 40) en phase de stress.

3.3. Production des Lipides

Comme le montre la **Figure 3.4**, au début de la caroténogénèse, la concentration initiale des lipides était de $142,5 \pm 9,19 \text{ mg L}^{-1}$, cette concentration a augmenté jusqu'à $472 \pm 17,68 \text{ mg L}^{-1}$ au jour 14. Dans les conditions de carence en nitrate, la division cellulaire est arrêtée. L'augmentation de concentration, est due à une accumulation des substances de réserves, qui sont sous forme de lipides. La synthèse synchronisée des lipides et des caroténoïdes pendant le processus de caroténogénèse a été observée.

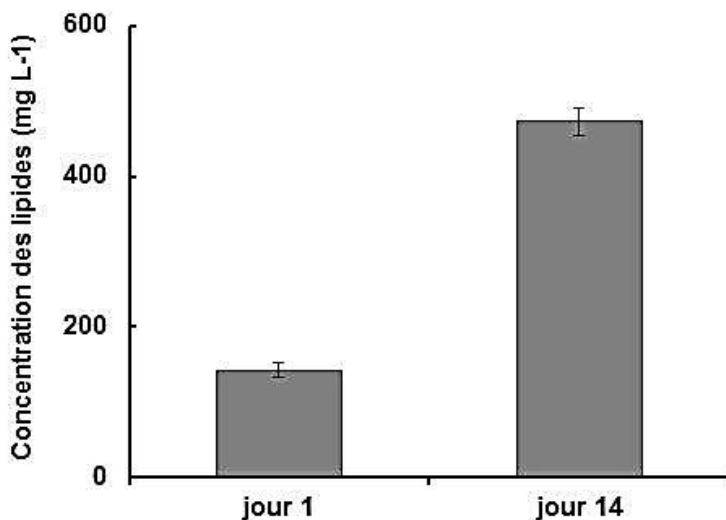


Figure 3.4 : Variation de la concentration des lipides (en mg L^{-1}) au premier et au dernier jour, durant la phase de stress.

3.4. La teneur en protéine et des enzymes

Durant la phase de la caroténogénèse, les cellules algales vont subir des changements protéiques et notamment enzymatique à cause de l'adaptation physiologique des cellules, il y'aurait une augmentation de certain enzymes, comme les enzymes antioxydants et également une diminution de la teneur d'autres enzymes.

Comme la montre la **Figure 3.5A**, la concentration initiale des protéines à la fin de la phase verte de croissance était de $0,22 \text{ mg mL}^{-1}$ de culture, cette concentration a diminué jusqu'à $0,19 \text{ mg mL}^{-1}$ de culture à la fin de la phase de stress. Des changements également de la concentration de l'enzymes qui a été étudiés 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 MDA (Malondialdehyde) de $0,009$ à $0,15 \text{ } \mu\text{mol mg}^{-1}$ et également une augmentation de la concentration de l'enzyme GST (Glutathion S-Transferase) de $0,115$ à $0,171 \text{ } \mu\text{mole mg}^{-1}$.

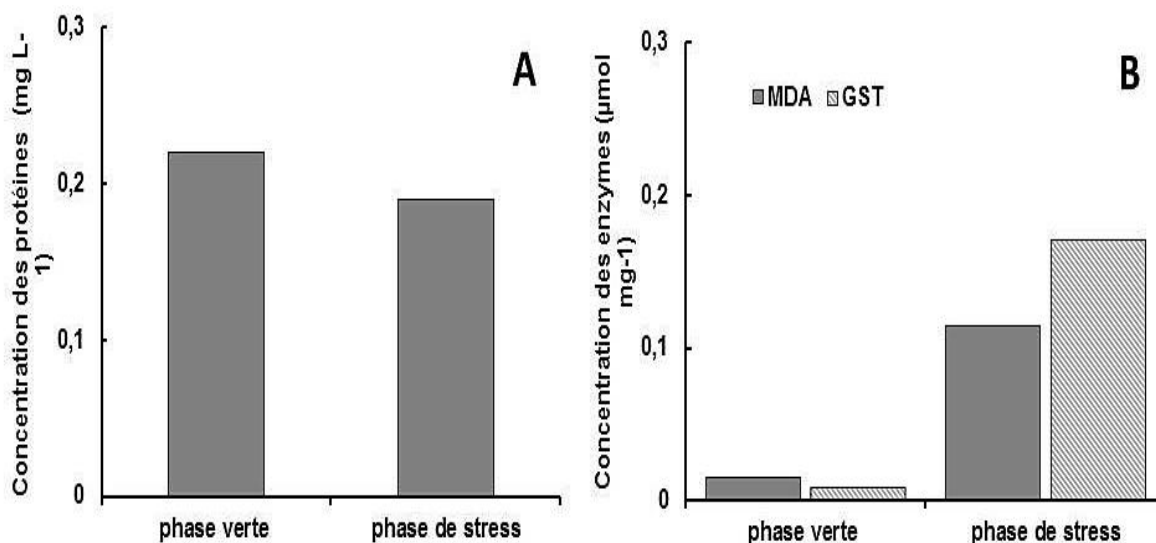


Figure 3.5 : A) Variation de la concentration des protéines (mg mL^{-1}) au dernier jour de la phase verte et de la phase de stress. B) Variation de la concentration des enzymes MDA et l'enzyme GST ($\mu\text{mole mg}^{-1}$) au dernier jour de la phase verte et de la phase de stress.

Lors de l'étude des variations de mobilité électrophorétique des enzymes Glutamate oxaloacétate transaminase (GOT) et l'alcool déshydrogénase (ADH) par la technique MLEE, aucune bandes 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 cellulaire et également des difficultés pour la lyse cellulaire dans les conditions non dénaturantes.

3.5. Profil protéique (SDS-PAGE)

Le profil des protéines totales, pour les cultures en phase de verte et les cultures en phase de stress est représenté sur la **Figure 3.6**.

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

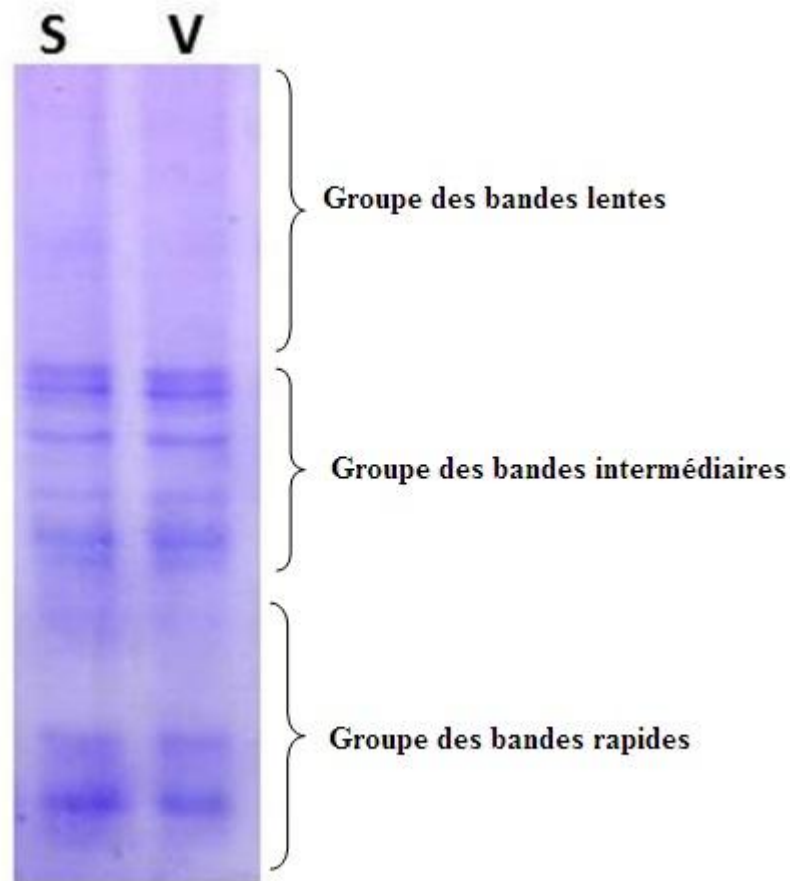


Figure 3.6 : Profils protéiques des cultures de *Acutodesmus sp.* strain SG-1 (V : phase verte, O : phase de stress).

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

4. Discussion

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 *Acutodesmus sp. strain SG-1*.

Une mise au point d'un bioprocédé pour la culture des microalgues a été réalisé et utilisé durant notre travail. Ce dernier avait pour objectif de faire un suivi des changements protéiques et enzymatiques au cours du processus de la caroténogénèse.

Dans notre travail, 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 de 7.5 g.L^{-1} de NaCl. Cette combinaison de stress a eu une grande influence sur l'état morphologique et physiologique des cultures algales.

Notre travail a commencé par une culture de croissance ou une phase verte, pour produire suffisamment de biomasse algale qui a été utilisée durant le processus de la caroténogénèse. La phase verte a été caractérisée par une augmentation de la concentration cellulaire (**Figure 3.1**) l'augmentation du poids sec est due au mode de culture phototrophe durant cette phase, qui a été favorable pour une croissance optimale suite à la disposition de l'ensemble des éléments nécessaires pour une bonne croissance ; éléments nutritifs, CO_2 avec l'intervention de la lumière solaire. Cette phase a été caractérisée également par une forte

consommation du nitrate dans le milieu (**Figure 3.2.A**), ce qui a causé un appauvrissement de cet élément vers la fin de cette phase (jours 10). Les microalgues ont besoin de l'azote, et d'autres micronutriments pour leur croissance. Ils peuvent fixer le dioxyde de carbone de l'air grâce à la photosynthèse tout en prenant l'azote et de phosphore de leur milieu (Lee *et al.*, 2001). Les microalgues peuvent utiliser le nitrate comme source d'azote pour leur croissance. Des composés contenant de l'azote tels que l'ATP et le NADPH sont activement produits au cours de la phase photosynthétique.

La phase de croissance a été caractérisée également par une augmentation du pH du milieu (**Figure 3.2B**). Cette augmentation du pH est due à une diminution du CO₂ du milieu en relation avec l'activité photosynthétique au cours de la croissance de l'algue (Bellahcent *et al.*, 2013). En effet, le CO₂ réagit avec les carbonates du milieu selon la relation suivante :

$3\text{HO}^- + 2\text{CO}_2 + \text{CO}_3^{2-} \leftrightarrow 3\text{HCO}_3^- + 3\text{e}^-$. Ainsi, pour chaque molécule de CO₂ mobilisée, deux ions bicarbonates vont se dissocier et une molécule de CO₂ sera produite qui sera à son tour hydrolysée comme suit : $\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{OH}^- + 2\text{H}^+ + 3\text{e}^-$. Il se reconstitue une molécule de bicarbonate et un ion OH⁻ ce qui amène à l'élévation du pH qui est constaté pendant la croissance notamment durant la phase exponentielle. (Doumandji *et al.*, 2011).

Différents types de stress ou de leurs combinaisons peuvent avoir une influence sur la synthèse et l'induction de certains métabolites de valeur importantes dans les microalgues. Les combinaisons de stress osmotiques, carence en azote et en phosphore, et les stress oxydatifs causés par les fortes intensités lumineuses sont particulièrement efficaces (Solovchenko, 2013). En effet, les intensités lumineuses élevées provoquent une sursaturation du photosystème où les photons sont absorbés en excès et une partie considérable de l'énergie de la lumière incidente ne peut pas être utilisée dans des réactions photochimiques (Solovchenko, 2010). En conséquence l'excédent d'énergie conduit à la formation des dérivés réactifs de l'oxygène (DRO). Les caroténoïdes primaires ne peuvent pas piéger suffisamment les radicaux, des mécanismes supplémentaires sont alors nécessaires afin de les éliminer ou de réduire l'éclairage atteignant l'appareil photosynthétique dans de telles conditions (Bar *et al.* 1995). Un tel état est imposé par des flux élevés de rayonnement solaire et par d'autres facteurs qui limitent le taux de fixation du CO₂ (salinité élevée, stress nutritionnels, des températures extrêmement élevées ou basses, etc...) (Solovchenko, 2010). En outre, les caroténoïdes secondaires peuvent réduire le stress oxydatif en réduisant la quantité de photons qui atteignent les complexes de pigments collecteurs de lumière (Hagen *et al.* 1994).

La phase verte a été suivie par la phase de caroténogénèse. La combinaison de stress utilisée ; intensité lumineuse, carence en nitrate et un stress osmotique ont été efficaces pour induire le processus d'accumulation et de production des caroténoïdes secondaires dans notre études.

Durant le processus de la caroténogénèse le poids sec des cellules a augmenté (**Figure 3.1**). 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 3.3**).

La synthèse synchronisée des lipides et des caroténoïdes pendant le processus de caroténogénèse a été également observée, suite à la dégradation des caroténoïdes primaire et la production des caroténoïdes secondaire qui a été constaté suite au changement de la couleur des cultures algales. L'augmentation de la concentration en NaCl du milieu favorise le stockage des lipides mais limite fortement la croissance, Si les microalgues subissent un stress en fin de croissance exponentielle, elles peuvent augmenter leur contenu lipidique et atteindre 19 % de lipides en cas de stress de nitrate (Amaury Massart *et al.* 2011). Une carence en azote du milieu de culture, pour une quantité donnée de biomasse, était favorable à la production de caroténoïdes. (Plus la concentration en azote est faible, plus la quantité de caroténoïdes produite est élevée) (Claude Gudin, 1989), La production des caroténoïdes résulte d'un mécanisme naturel pour la protection des microalgues contre l'effet du stress, leur rôle est de neutraliser les espèces réactives de l'oxygène (Del Campo *et al.* 2007).

Un système cellulaire antioxydant de défense bien développé incorpore des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques. 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 anti-oxydantes telles que la superoxyde dismutases (SOD), la glutathion peroxydase (GPX), la glutathion réductase (GR), l'ascorbate peroxydase (APX) et catalases (Mallick et Mohn, 2000).

La superoxyde dismutase (SOD) a le rôle de conversion de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), puis la catalase (CAT) a le rôle de l'élimination de l' H_2O_2 . L'acide ascorbique (ASA) et le glutathion réduit (GSH) sont des antioxydants non enzymatiques essentiels pour l'élimination de l' H_2O_2 dans le cycle ascorbate-glutathion (AGC). Dans l'AGC, le GSH est fréquemment utilisé comme un donneur d'électrons à oxyder

en disulfure de glutathion (glutathion oxydé dire, GSSG) pour diminuer la déshydroascorbate (DHAsA) afin de produire AsA (Hong *et al.* 2008).

Dans notre travail, nous avons observé une diminution de la teneur en protéines entre la phase de croissance et la phase de stress (**Figure 3.5A**), cette diminution de la concentration est due probablement à une adaptation physiologique des cellules qui provoque une inhibition de la production de certaines protéines et induit la production et l'accumulation d'autres protéines, notamment celles qui sont responsables de protection contre le stress. Comme il a été constaté par les changements de la concentration des deux enzymes qui ont été étudiés 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' MDA (Malondialdehyde) et également une augmentation de concentration de l'enzyme GST (Glutathion S-Transferase). Le malondialdéhyde est présent naturellement dans les tissus, où il est une manifestation du stress oxydant. Il est issu notamment de l'action des dérivés réactifs de l'oxygène sur les acides gras polyinsaturés. Il réagit avec la désoxyadénosine et la désoxyguanosine pour former des adduits à l'ADN. Les glutathion S-transférases (GSTs) sont une famille multigène d'isoenzymes qui catalysent la conjugaison du glutathion à des substrats électrophiles. Ces enzymes sont impliquées dans la détoxification des électrophiles endogènes et exogènes qui peuvent réagir avec des composants cellulaires tels que l'ADN. L'augmentation de ces enzymes et du à leur rôle de protection, durant cette phase ou processus de la caroténogénèse. Dans l'étude des variations de mobilité électrophorétique des enzymes Glutamate oxaloacétate transaminase (GOT) et l'alcool déshydrogénase (ADH) par la technique MLEE, aucune bandes 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 cellulaire et également des difficultés pour la lyse cellulaire dans les conditions non dénaturantes.

L'utilisation de l'électrophorèse des protéique (SDS-Page), a permis d'obtenir le profil de l'ensemble des protéines (**Figure 3.6**). On constate que les diagrammes des protéines totales présentent des différences d'intensités des bandes protéiques de mobilité intermédiaire, et également les protéines de mobilité rapide. Cela est le résultat de l'ensemble des modifications physiologiques des cultures algales au cours de la phase de la caroténogénèse, avec une augmentation de certaines protéines (responsable du stress) et diminution d'autres types de protéines.

Conclusion

Conclusion

La production biologique de caroténoïdes par les microalgues est un procédé prometteur et plus respectueux de l'environnement que la synthèse chimique. Les résultats de notre étude ont montré que le bioprocédé qui a été conçu pour la culture de la souche *Acutodesmus sp. strain* SG-1 est fiable et peut être utilisé pour la culture d'autres souches algales. La combinaison de stress utilisé dans notre étude a eu une grande influence sur l'état morphologique et physiologique des cultures algales ; une induction de la production des caroténoïdes, accompagné d'une production synchrone des lipides et également un changement et une augmentation de la teneur en protéines, et des enzymes associé au stress oxydatifs. Dans le but de maximiser la production de ces pigments et de ces molécules de grandes valeurs par les microalgues, des études sur les changements d'autres enzymes antioxydants seront importantes et complémentaires pour bien comprendre la corrélation avec le processus de la caroténogénèse.

Références bibliographiques

Annexes

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 a 1 L avec de l'eau distillée.

Solution de traces elements (7)

Ajouter à 1000 ml d'eau distillée 0.75 g Na₂EDTA :

- 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 in 100 ml 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 coll., 1951 modifiée par Pelmont, 1995. La courbe d'étalonnage est réalisée par la BSA 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 mn à l'obscurité puis lire à 700 nm (modifiée).

3. Dosage des activités enzymatiques

3.1. 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

3.2. Dosage de la glutathion s transférase

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

3.2.1. Préparation des solutions :

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

GSH 50 mM pH 6,5.

CDNB 30 mM

3.2.2. 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 minutes du blanc et du test.

Calculs :

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

3 : volume total (ml)

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

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

Unités /mg de protéines = Unités/ml enzyme / 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.

Dosage du MDA

0,5 ml d'extrait

0,5 ml TBA (1% 100)

1 ml TCA (10%)

Incubation au bain mari (95° pendant 30 mn)

Refroidissement des tubes (bain de glace)

Centrifugation pendant 15 mn (à 10 000G)

Lecture de l'absorbance à 535 et à 600.

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 mi et le surnageant mis en suspension dans 50 μ L de tampon de lyse et soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% en conditions dénaturantes.

1.1 Préparation du tampon d'extraction (tampon de lyse) :

- Tris 25mM
- 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 (Solution mères)

2.1 Solution d'acrylamide

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

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

- Tris 3M 72.7 g
- SDS 0,8% 1,6 g
- 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% 0,8 g

- 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 25ml

3.2 Préparation du gel de concentration à 7,5%

- Solution d'acrylamide 5ml
- Tampon de concentration 5ml
- 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 1,06 g
- Glycine 0,192M 5,04 g
- SDS 0,1% 0,35 g
- 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 4 cm 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 minutes, 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 5 h, 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 tricholacétique (TCA) 60% 40 ml.
- Eau distillée QSP 200 ml.

Mettre le gel dans 200 ml 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 mi 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 mi à 4°C. 100ul de chaque surnagent 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 a l' obscurité et a 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 a l' obscurité et a 37°C jusqu'à apparition des bandes.

Résumé

Au cours des dernières années, l'utilisation de micro-organismes photosynthétiques, comme les microalgues, a reçu une attention croissante en raison de leur intérêt phytochimique avec différentes structures chimiques et des activités biologiques diverses. Face à des conditions de stress différentes, ces microalgues peuvent accumuler des molécules à haute valeur, notamment les caroténoïdes secondaires. Les résultats de notre étude ont montré que le bioprocédé qui a été conçu pour la culture de la souche *Acutodesmus* strain SG-1 est fiable et peut être utilisé pour la culture d'autres souches algales. Durant le processus de la caroténogénèse, une induction de la production de caroténoïdes, accompagnée d'une production synchrone des lipides et également un changement et une augmentation de la teneur en protéines, des enzymes associées au stress oxydatif a été constaté. Dans le but de maximiser la production de ces pigments et de ces molécules de grande valeur par les microalgues, des études sur les changements d'autres enzymes antioxydants seront importantes et complémentaires pour bien comprendre la corrélation avec le processus de la caroténogénèse.

Mots clés : *Acutodesmus* strain SG-1, caroténoïdes, protéines, enzymes, bioprocédé.

المخلص :

بالإضافة إلى دورها الأساسي المتمثل في تزويد الغلاف الجوي بالأكسجين, للطحالب الدقيقة القدرة على تخليق جزيئات تدعى (الكاروتينات) في ظل ظروف معينة, هذه الأخيرة لها قيمة بيولوجية في مجال التغذية وصناعة مستحضرات التجميل وفي مجال الطاقة .

في هذا العمل نوع جديدة من الطحالب الخضراء المستخرجة من الصحراء الجزائرية *Acutodesmus Scenedesmaceae* تم اختبار قدرتها على إنتاج الكاروتينات (النااتجة عن آلية التمثيل الغذائي للحماية ضد ظروف الإجهاد). من خلال سلسلة من التحليلات, ورصد التغيرات الفيزيولوجية عند هذه الطحالب.

لذلك قمنا بتوليد آلية تخليق الكاروتينات عند الطحالب في المختبر داخل وسط النمو الخاص بها تحت تأثير ثلاث أنواع من الإجهاد المتمثلة في نقص النترات (النيتروجين), ارتفاع نسبة الملوحة عن طريق إضافة خلات الصوديوم, وزيادة الشدة الضوئية دون انقطاع .

النتائج يتم عرضها في الفصل الثالث من هذا العمل .

في النهاية نستنتج أن الطحالب *Acutodesmus Scenedesmaceae* لديها العديد من المزايا للسنوات القادمة في مجالات الزراعة والأدوية خاصة في مستقبل التكنولوجيا الحيوية.

الكلمات المفتاحية: الطحالب، الكاروتينات والمواد الملونة والتمثيل الضوئي، والتكنولوجيا الحيوية والإجهاد، تخليق الكاروتينات *Acutodesmus Scenedesmaceae*

Summary

During the last years, the use of photosynthetic microorganisms, as the microseaweeds, received one increasing attentions because of their phyto­m­etabolique interest with various chemical structures and diverse biological activities. In front of different conditions of stress, these microseaweeds can accumulate molecules with high value, in particular the secondary carotenoids. The results of our study showed that the bioprocess, which was conceived for the culture of the stump *Acutodesmus* sp. strain SG-1, is reliable and can be used for the culture of the other algal stumps. During the process of the carot­enog­en­ese, an induction of the production of carotenoids, accompanied with a synchronous production of lipids and also a change and an increase. Of the protein content, the enzymes partner in the stress oxidative was noticed. With the aim of maximizing the production of these pigments and these molecules of big values by microseaweeds, studies on the changes of the other enzymes antioxidants will be important and complementary to understand well the correlation with the process of the carot­enog­en­ese.

Références

A :

- 1- Abe.K, Hattor. H, Hiran. M,2005.«Accumulation and antioxidant activity of secondary carotenoids in the aerial microalga *Coelastrella striolata* var. *multistriata*». *Food Chem*, (100).pp. 656–661.
- 2- Amaury Massart, Élise Aubry, Anne-Lise Hantson, 2011. « Étude de stratégies de culture de *Dunaliella tertiolecta* combinant haute densité cellulaire et accumulation de lipides en vue de produire du biodiesel». *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* Volume 14, Numéro 2, pp 567-572.
- 3- Ana Catarina Guedes, Helena M. Amaro and Francisco Xavier Malcata, 2011. «Microalgae as Sources of Carotenoids». *marine drugs*. (9).pp. 625-644.
- 4- Andersen R. A,2005. « Algal culturing techniques». *Academie Press Publications,Elsevier*, 565 p.
- 5- Armstrong, G.A.1999. « Carotenoid genetics and biochemistry». In: *Comprehensive natural products chemistry*. (Barton, D.H.R. and Nakanishi, K., Eds.), pp321-352.

B:

- 6- Bar, E., Rise, M., Vishkautsan, M., Arad, S., 1995.Pigment and structural changes in
- 7- *Chlorella zofingiensis* upon light and nitrogen stress. *J. Plant Physiol.* 146, 527–534.
- 8- Brack, André et Paul Mathis. 2000. "La Chimie du vivant - de la protéine à la photosynthèse". Éditions Le Pommier série Quatre à Quatre, Le Pommier-Fayard, France, 157 p.
- 9- Becerra Celis.G.P, 2009. «Proposition de Stratégies de Commande pour la Culture de Microalgues dans un Photobioréacteur Continu». Thèse de Doctorat, Ecole Centrale des Arts et Manufactures, 243 p.
- 10- Becker W. (a), 2004 « Microalgae in human and animal nutrition »,
- 11- In: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Richmond A. (ed.), Blackwell Publishing Ltd., Oxford,. pp 312-351.
- 12- Belkadi. M.E.A. 2009 « Etude Technique pour la Valorisation Energétique des Microalgues». Mémoire de Magister en Management des Projets Energétique, Université M'Hamed Bougara, Boumerdes,. 49 p.
- 13- Ben-Amotz A.1999 « *Dunaliella* β -carotene: from science to commerce. In: Seckbach J (ed) *Enigmatic microorganisms and life in extreme environments*». Kluwer, Netherlands,. pp 401–410.
- 14- Bradford, M.M. (1976), "Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- 15- Brennan, Liam, et Philip Owende. 2009. «Biofuels from microalgaeA review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products ». *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, N°805; vol 21.
- 16- Burch P.,Martin JP,1990. « Production of oxygen radicals by photosensitization». *Methods Enzymol*, (186) pp 635-645.

C:

- 17- Cadoret.J.P and O. Bernard, 2008. « La Production de Biocarburant Lipidique avec des Micro algues: Promesses et Défis». Journal de la Société de Biologie, Vol 202, N°3, pp 201 – 211.
- 18- Cantin.I ,2010. «La Production de Biodiesel à Partir des Micro Algues ayant un Métabolisme Hétérotrophe».Canada, Centre Universitaire de Formation en Environnement, Université de Sherbrooke, 87 p.
- 19- Certik M. and S. Shimizu, 1999. « Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production », Journal of Bioscience and Bioengineering, 87 (1), pp1-14.
- 20- Chabrol, E. and Castellano, A.1961, SPV method for estimation of total serum lipid. Lab. Clin. Med.,57:300.
- 21- Claude Gudin , Xavier Berson, Michel Bouyssou, Yves Castel, Daniel Chaumont , 1989. «Apparatus for the intensive, controlled production of microorganisms by photosynthesis ».
- 22- Clotault J, Geoffriau E, Lionneton E, Briard M, Peltier D (2010) Carotenoid biosynthesis genes provide evidence of geographical subdivision and extensive linkage disequilibrium in the carrot. Theor Appl Genet 121:659–672
- 23- Cornet J.-F., C.G. Dussap, J.-B. Gros, 1998. « Kinetics and energetic of photosynthetic micro-organisms in photobioreactors: application to spirulina growth », Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 59, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 153-222.
- 24- Coutteau P, 1996. « Micro-Algae »,FAO Fisheries Technical Paper 361.

D:

- 25- Demirbas. A. and M.F. Demirbas. 2010. « Algae Energy: Algae as a New Source of Biodiesel» .London, Springer, pp29 – 47.
- 26- Doré-Deschênes. François , 2009. «Utilisation des microalgues comme source d'énergie durable». Centre universitaire de formation en environnement université de Sherbrooke Longueuil, Québec, Canada, PP 13-18.
- 27- DOUMANDJI Amel a, BOUTEKRABT Lynda a, SAIDI Nabil Amar b, DOUMANDJI Soumeyac, HAMEROUCH Djazia a et HAOUARI Samiha, 2011. « Etude de l'impact de l'incorporation de la spiruline sur les propriétés nutritionnelles, technologiques et organoleptiques du couscous artisanal, nb° 06, Pages 40 à 50.

E :

- 28- El-Baky.H.H.A, El-Baroty.G.S. 2011, « Enhancement of carotenoids in Dunaliella salina for use as dietary supplements and in the preservation of foods». Food Chem. Toxicol. in press.
- 29- Erell Olivo. 2007.«Conception et etude d'un photobioreacteur pour la production en continu de microalgues en Ecloséries aquacoles». Centre universitaire de Nantes , pp 19-26 .

F :

- 30- Folch J,Lees M, Sioane-Stanley GA(1957)A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. J Biol Chem 266,497-509
- 31- Fox R.D. 1999. «Spiruline, Technique, pratique et promesse».Edisud, France, 246 pp.

32- Fraser, P.D. and Bramley, P.M. . 2004, « The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids». Prog. Lipid Res. (43), pp 228-265.

G:

33- Gouveta.L, 2011. « Microalgae as a Feedstock for Biofuels». London: Springer, Pp 1 – 69

34- Grama. Borhane Samir , ChaderSamira ,Khelifi Douadi , Stenuit Benoît,Jeffryes, Clayton . 2014. «Characterization of fatty acid and carotenoid production in an *Acutodesmus* microalga isolated from the Algerian Sahara» Journal of périodique, Vol. 69, no.0, p. 265-275

H:

35- Hagen, C., Braune, W., and Björn, L., 1994. Functional Aspects of Secondary Carotenoids in

36- *Haematococcus lacustris*(Volvocales): 3. Action as a Sunshade. *J. Phycol.* vol. 30, pp. 241–248.

37- Harker, M., Tsavalos, A.J. et A.J. Young,1996. «Factors responsible for astaxanthin formation in the Chlorophyte *Haematococcus pluvialis*». Bioresource Technology, vol 55,p. 207-214. Elsevier Science Limited.

38- Hong, W., Zhao, X.H., Zhou J.X. and Suo, Z.G., 2008. «A theory of coupled diffusion and large 39- deformation in polymeric gels». *J. Mech. Phys. Solids* 56, 1779-1793.

40- Hu C-C, Lin J-T, Lu F-J, Chou F-P, Yang D-J. 2008. «Determination of carotenoids in *Dunaliella Salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract». *Food Chem*, (109), pp 439–446.

41- Hansmann, E. (1973) Pigment Analysis. In: Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements. [Ed] Janet Stein. Cambridge Press.

J:

42- José A Del Campo, & Mercedes García-González & Miguel G. Guerrero ,2007. «Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives». *Appl Microbiol Biotechnol*, (74).pp1163-1174.

43- Jupin, H. et A. Lamant. 1999. « La Photosynthèse». Dunod- collection Sciences sup 2e cycle, Paris, 268 p.

K:

44- Karrer.p et E.Jucker, 1950 :caroténoides ,Elsevier,N .Y. 384p.

L:

45- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-185.

46- Lee, J., Lee, J., & Feick, L. (2001). The impact of switching costs on the customer satisfaction–loyalty link: Mobile phone service in France. *Journal of Services Marketing*, 15, 35–48

47- Lee Kwangyong and Choul-Gyun Lee, 2001, « Effect of Light/dark Cycles on Wastewater Treatments by Microalgae Biotechnol». *Bioprocess Eng.*(6) pp 194-199.

- 48- Lemoine .Y, B Schoefs ; 2010. «Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress». *Science Report* Vol 106 (155-177)
- 49- Louka Sirois «Changements physiologiques chez les mlcroalgues vertes menant à la biosynthèse de caroténoïdes »2013 , N° 8,pp(4-39).

M:

- 50- Macías-Sánchez.M.D, Fernandez-Sevilla.M, Acién-Fernández.F.G, Cerón-Garcia. M.C, Molina-Grima.E. 2010. «Supercritical fluid extraction of carotenoids from *Scenedesmus almeriensis*». *Food Chem*, (123).pp 928–935.
- 51- Mallick, N., Mohn, F.H., 2000. Reactive oxygen species: response of algal cells. *J. Plant Physiol.* 157, 183-193.
- 52- Maryline Abert Vian, Céline Dejoye Tanzi et Farid Chemat , 2013. « Techniques conventionnelles et innovantes, et solvants alternatifs pour l'extraction des lipides de micro-organismes», Vol 20, N° 6.
- 53- Mata.T.M . 2010. «Microalgae for biodiesel production and other applications». *RENEWABLE & SUSTAINABLE ENERGY REVIEWS*,14(1).pp.217-232.

N:

- 54- Ndoye I, Sylla S. N. (2000). Diversity of rhizobia isolated from two *Pterocarpus* species and nitrogen fixing potential of symbiosis. Ninth Congress of the African Association for Biological Nitrogen Fixation, Nairobi, Kenya, September 25 – 29.
- 55- Nicola Tazzini; « what are carotenoids? » *J.Tuscany Diet Nutrition and wellness*, 2013.

P :

- 56- Pulz O. 2001. «Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms». *Appl. Microbiol. Biotechnol*, (57).pp 287–293.
- 57- Pulz, O. et Gross ,W. 2004. « précieux produits bruts issus de la biotechnologie des microalgues», (65), pp 635-648.

R :

- 58- Rabbani.S, Beyer. P, von Lintig. J, Hugueney. P, Kleinig. H. 1998. «Induced β -carotene synthesis driven by triacylglycerol deposition in the unicellular alga *Dunaliella bardawil*». *Plant Physiol*, (116), pp 1239–1248.
- 59- Richmond, A. 2004. « Manuel de microalgues Culture, biotechnologie et Phycologie appliquée». Blackwell Science: Oxford, Royaume-Uni
- 60- Rice, K. G., Ashby, J. S., & Slaney, R. B. (1998). Self-esteem as a mediator between perfectionism and depression: A structural equations analysis. *Journal of Counseling Psychology*, 45(3), 304-314.
- 61- Richmond A. 1987. « Microalgal culture ». *Critical Reviews*.In: *Biotechnology*,pp.369-438.
- 62- Richmond A. 1986.« Handbook of microalgae mass culture». Bocaaton, Florida: CRC Press Inc.
- 63- Rodolfi L, Chini Zittelli G, Bassi N. 2009. «Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor». *Biotechnol. Bioeng*, (102).pp 100–112.

- 64- Rojan. P.J, Anisha.Gouveta.S., K.M. Nampoothiri and P. Ashok. 2011. « Micro and Macroalgal Biomass: A Renewable Source for Bioethanol». Bioresource Technology, Vol 102, N°1, pp 186 – 193.

S:

- 65- Sanchez Mirón A, Contreras Gómez A, Garcia Camacho F, Molina Grima E, Chisti Y. 1999. «Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae». J. Biotechnol, (70).pp 249–270.
- 66- Selander .R.K.,CaugantD.A.,Ochman.H.,Musse.J.M.,Gilmour.M.N.,Whittam.T.S., 1986. «Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics». Applied an Environmental Micrbiology 51(5):873-884.
- 67- Skulberg.OM.2006, « Bioactive chemicals in microalgae». In: Richmond A. (ed.) « Handbook of microalgalculture, biotechnology and applied phycolog».y. Oxford: Blackwell.p 485-512.
- 68- Solovchenko A. E., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z., Boussiba, S. and Merzlyak, M. N. 2010. «Coordinated carotenoid and lipid syntheses induced in *Parietochloris incisa* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) mutant deficient in desaturase by nitrogen starvation and high light». Journal of Phycology 46: 763-772.
- 69- Solovchenko, A., Solovchenko, O., Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Pal, D., Cohen, Z., Boussiba, S. 2013. «Probing the effects of high-light stress on pigment and lipid metabolism in nitrogen-starving microalgae by measuring chlorophyll fluorescence transients»: Studies with a $\Delta 5$ desaturase mutant of *Parietochloris incisa* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). Algal Research 2: 175-182
- 70- Stirbet A and Govindjee (2011) «On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient». J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 104: 236-257
- 71- Świątek.Z, 2010. « Algae – Feedstock of the Future». Archivum Combustionis, Vol 30, N°3, pp 225 - 235.

Z :

- 72- Zheng Sun. Jin Liu. Yan Hui Bi. Zhi-gang de Zhou. 2014. «Les microalgues comme la plate-forme de production de caroténoïdes». JOMICS Publishing Group.

Bouchoucha Abla Boufes Hadjer

juin 2015

Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

Biochimie Moléculaire et Santé

Thème :

Modification protéique et enzymatique de la souche *Acutodesmus* sp. strain SG-1 durant le processus de la caroténogénèse

**diplôme de Master en Biochimie
Moléculaire et Santé**

Résumé

Au cours des dernières années, l'utilisation de micro-organismes photosynthétiques, comme les microalgues, a reçu une attention croissante en raison de leur intérêt phytochimique avec différentes structures chimiques et des activités biologiques diverses. Face à des conditions de stress différentes, ces microalgues peuvent accumuler des molécules à haute valeur, notamment les caroténoïdes secondaires. Les résultats de notre étude ont montré que le bioprocédé qui a été conçu pour la culture de la souche *Acutodesmus* sp. strain SG-1 est fiable et peut être utilisé pour la culture d'autres souches algales. Durant le processus de la caroténogénèse, une induction de la production de caroténoïdes, accompagnée d'une production synchrone des lipides et également un changement et une augmentation de la teneur en protéines, des enzymes associées au stress oxydatif a été constaté. Dans le but de maximiser la production de ces pigments et de ces molécules de grande valeur par les microalgues, des études sur les changements d'autres enzymes antioxydantes seront importantes et complémentaires pour bien comprendre la corrélation avec le processus de la caroténogénèse.

Mots clés : *Acutodesmus* sp. strain SG-1, caroténoïdes, protéines, enzymes, bioprocédé.

Président : Professeur Khelifi Douadi

Examinatrice: Dr. Bellil Ines

Encadré par : Dr. Grama Borhane Samir

**Université Frères Mentouri Constantine
2014-2015**