République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique
Université Yahia Farés de Médéa
Faculté des Sciences

Mémoire pour l'obtention du diplôme de
Master en Biologie

Spécialité : Microbiologie appliquée

Thème

EFFET DE COMPOSITION DE MILIEU SUR LA CROISSANCE DE LA BIOMASSE ALGALE ET L'ACCUMULATION DES LIPIDES CHEZ *Arthrospira platensis*

Présenté par :

ALI TURKI Soumia

SI MOUSSA Souhila

Soutenue publiquement le 07/07/2019

Devant le jury composé de :

Président	BOUDJEBOUR Abdelmadjid	MAA	Université de Médéa
Examinateur 1	CHAMI Bouazza	MAA	Université de Médéa
Examinatrice 2	BOUHRAMA Amina	MAA	Université de Médéa
Promoteur	AINES Mahfoud	MCB	Université de Médéa

Médea,2018/2019

Dédicace

Je dédie ce modeste travail qui est le fruit de plusieurs années d'étude

à Dieu le tout puissant, le très Miséricordieux .Que tout la gloire revienne à Allah qui par sa puissance et sa Majesté, m'a soutenu durant tout mon cycle et m'a donné le courage, la force et la santé nécessaire pour la réalisation de ce travail.»

A celle qui m'a transmis la vie, l'amour, le courage, à toi chère ***Maman*** *toutes mes joies, mon amour et ma reconnaissance.*

A ***mon père*** *qui a souhaité vivre pour longtemps juste pour nous voir Qu'est-ce que nous allons devenir*

A mes chères sœurs ***Assma*** *,* ***Marwa*** *,* ***Ikram*** *, mon cher frère* ***Sid Ahmed***

Ma petite nièce ***Ihsene***

A mes chères amies : ***Souhila*** *,* ***Meriem*** *,* ***Imene*** *,* ***Ilham*** *…..*

A vous mon très cher professeur ***Mr AINES***

A tous ceux que j'aime

A moi-même.

Soumia



Dédicace

A mes chers-parents ; Pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études, je ne pourrais jamais exprimer le respect que j'ai pour vous. Vos prières, vos encouragements et votre soutien m'ont toujours été d'un grand secours. Puisse Dieu, le tout puissant vous préserver du mal, vous combler de santé, de bonheur et vous procurer une longue vie.

A celui que j'aime beaucoup et qui m'a soutenue tout au long de ce projet ,mes frères et soeurs: Adlane , Zaki, Ahmed , Nasima,Aicha,Djahida et Marwa et leurs enfants : Wiaam, Sifo, Asmaa,Adam,Israa,Hanane,Mohammed . pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral .

À ma chère professeure Siham Ghazzazi, qui m'a soutenue dans ma carrière et m'a stimulée depuis que je suis toute petite.

A mon amie qui a partagée le travail :Soumia

A toute ma famille Si moussa pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire.

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis merci

Souhila

Remerciements

Avant toute chose, nous tenons à remercier Dieu le tout puissant, pour nous avoir donné la force et la patience pour terminer ce travail.

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu voir le jour sans l'aide et l'encadrement de ***Mr.AINAS*** *: Un remerciement particulier et sincère pour tous vos efforts fournis, vous avez toujours été présent. Que ce travail soit un témoignage de notre gratitude et notre profond respect.*

Nos remerciements vont également aux membres de jury :Mr. BOUDJEBOUR ,Mr. CHAMI, Mme. BOUHRAMA .

Nous remercions les ingénieurs de laboratoire de microbiologie .Faculté des sciences à tous leurs efforts et leur aide pour réaliser la partie expérimentale .

Enfin nous voulons dire merci à tous les enseignants du département de biologie l'université de Yahia Fares.



Soumia

Souhila

Liste des abréviations

ATP : Adenosine triphosphate.

ARN : Acide ribonucléique.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

°C :Degré Celsius**.**

CO_2 : Dioxyde de carbone.

Ch a :Chlorophylle a.

D.O : Densité optique .

G : Temps de génération.

G3P : Glycérol-3-phosphate .

g/l :Gramme par litre .

h : Heure .

min :Minute .

mg/l/j :Milligramme par litre par jour.

Mz :Milieu Zarrouk.

M 0.03 :Milieu stressant de 0.03g/l NaNO3.

M 0.1 :Milieu stressant de 0.1g/l NaNO3.

ml : Mililètre.

P.S : Poids sec .

PSI : Photosystème I.

PSII : Photosystème II.

PV : Productivité volumique .

PC :Poids chargé .

Liste des abréviations

pf :Poinds final .

po :Poids initial.

Psu:Pratical Salinity Unit

t : Temps.

tpm : Tour par minute .

TAG : Acide triglyceride.

V : Volume .

VLCFA : Very Long Chain Fatty Acid .

X : Concentration en biomasse.

μ max : Vitesse de croissance maximale.

λ : La logeur d'onde .

Liste de nomenclature

$CaCl_2$: Chlorure de calcium .

Ca :Calicum.

$Co\ (NO_3)_2, (6\ H_2O)$: Nitrate de cobalt .

$CuSO_4, (5\ H_2O)$: Sulfate de cuivre .

DMSO : Diméthylsulfoxyde .

EDTA : Acide éthylène diamino-tétra-acétique.

$FeSO_4, (7H_2O)$: Sulfate ferreux monohydrate .

.

HMF : Hydroxy-méthylfurfural .

H_2S : Sulfure d'hydrogène .

KOH : hydroxyde de potassium .

$K_2Cr_2\ (SO_4)_4, (24H_2O)$: Chromium potassium sulfate .

K_2HPO_4 : Phosphate d'hydrogène de potassium .

K_2SO_4:Sulfate de potassium .

Mg : Magnésium .

$MgSO_4, (7H_2O)$: Heptahyrate de sulfate .

$MnCl_2, (4H_2O)$: Chlorure de magnésium .

MoO_3 : Trioxyde de molybdène.

Liste de nomenclature

N :Azote **.**

Na_2WO_4, ($2H_2O$) : Tungstate de sodium .

NaCl : Chlorure de sodium.

$NaHCO_3$: Bicarbonate de sodium.

Na_2CO_3 : Carbonate de sodium.

Na_2CO_3 : Carbonate de sodium .

$NaHCO_3$: Bicarbonate de sodium .

$NaNO_3$: Nitrate de potassium .

NH_4VO_3: Vanadate d'ammonium .

LISTES DES FIGURES

Première partie : Synthèse bibliographique

Figure I.1 : Observation au microscope optique de souches droites.....10

et spiralées d'*Arthrospira* provenant du Burkina Faso

Figure I.2 : Différentes formes prises par la Spiruline 11

A = Forme spiralée (*Arthrospira fusiformis*) B= Forme ondulée (*Spirulina maxima*) C = *Arthrospira platensis*

Figur I.3 : Cycle biologique de la Spiruline.....11

FigureII.1: Teneur en lipide en fonction des conditions de cultur 22

Figure II.1 : Un triglycéride 22

Figure II.2 : Un phospholipide.....22

Figure II.3: Productivité en huile des micro-algues par rapport 24

à d'autres plantes (Hu et al., 2008)

Figure II.5 : Techniques d'obtention du biodiesel 30

Figure II.6 : Concept de production d'huile de micro-algues visant..... 31

à obtenir du biodiesel

Deuxième partie : Expérimentation, résultats et discussion

Figure I.1: Culture de la spiruline dans les conditions expérimentales 38

Figure I.2: Technique de filtration de spiruline..... 40

Figure I.3 : dilutions de suspension algale et séchage des filtres 43

Liste des figures

Figure I.4 : Etapes de détermination de la chlorophylle a 44
Figure I.5:Culture de spiruline sous conditions de carence en Azote 45

Figure I.6 : Différents milieux Zarrouk modifiés produits par 46

l'addition de mélasse

Figure I.7 : Culture de la spiruline avec différentes concentrations de mélasse 46

Figure I.8: Etapes de préparation de biomasse à extraire 47

Figure I.9 :Extraction des lipides d*'Arthrospira platensis* par 48
l'appareil de soxhlet
Figure I.10 : Evaporation du solvant par le rotavapeur 49

Figure II.1 : Filaments de forme droite à l'état normales ; observés 50

au microscope optique grossissementG40x

Figure II.2 : Observation de la spiruline dans le cas de stress azoté 51

Figure II.3 : Observation microscopique de spiruline en mixotrophie G10x..... 51

Figure II.4 : Observation microscopique la de Spiruline à l'objectif 52
100x après coloration de Gram
Figure II.5 : courbe étalonnage représente l'évolution de la.....52

densité optique en fonction de poids sec de spiruline

Figure II.6 : Courbe des valeurs d'absorbance (DO) de la culture témoin de la spiruline 53

Figure II.7 : Evolution de la croissance (poids sec) de la spiruline 54

en fonction de temps

Figure II.8 : Poudre de la spiruline après incinération 55

Figure II.9 : Lipides extraits par le Soxhlet 55

Liste des figures

Figure II.10 :lipides après évaporation au rotavapeur..... 55

Figure II.11 :Effet d carence en azote sur la teneur en lipides ,..... 56

chrolophylle et productivite volumique en biomasse de la spiruline

Figure II.12 : Effet de concentration de la mélasse sur la productivité..... 58

en biomasse de la spiruline

Figure II.13 : Effet de concentration de mélasse sur taux de chlorophylle a.....58

Figur II.14 : Effet de concentration de mélasse sur la teneur en lipides 59

Figure II.15 : Effect de l'intensité lumineuse sur la teneur de chlorophylle..... 59

et la productivité en biomasse

Figure II.16 : Effet de l'intensité lumineuse sur la teneur lipidique de la spiruline 60

Figure II.17 :Effect de température sur la productivité en biomasse 61

et la teneur en chlorophyle

Figure II .18 : Effet de la température sur la teneur lipidique de la spiruline.....62

LISTE DES TABLEAUX

Première partie : Synthèse bibliographique

Tableau I.1 : Confusions liées au terme de spiruline 6

Tableau I.2 : Caractéristiques communes des cyanobactéries aux algues.....7

et aux bactéries

Tableau I.3 : Position taxonomique d'*Arthrospira platensis* 7

Tableau I.4:Comparaisons morpho-anatomiques des genres *Spirulina* 8
et *Arthrospira*

Tableau I.5 : Tableau de la distribution géographique naturelle 13
d'*Arthrospira platensis*

Tableau I.6 : Tableau représentant le pourcentage des principaux acides gras 18
de la spiruline

Tableau II.1: Les différents modes trophiques pouvant être utilisés par 21
les microalgues

Tableau II.2:Productivité surfacique et teneur lipidique de différentes..... 25
espèces de microalgues

Deuxième partie : Expérimentation, résultats et discussion

Tableau I.1 : Conditions de culture pour l'extraction des lipides.....44

Tableau II.1 : Evolution de densité optique de la culture initiale.....50

(de contrôle) de la Spiruline en fonction de temps

Liste des tableaux

SOMMAIRE

Introduction ……. 1

Première partie : Synthèse bibliographique

CHAPITRE I: Généralités sur *Arthrospira platensis*

I.1. Origine de la spiruline: découverte et histoire ……4

I.2. Histoire de la spiruline ……4

I.3.Caractéristiques de la spiruline ……6

I.3.1. Confusions générales liées à la spiruline ……6

I.3.2. Caractéristiques communes de spiruline aux algues et aux bactéries ……7

I.3.3. Classification de la spiruline……7

I.3.3.1. Histoire de la classification……...7

I.4.Systématique de la spiruline ……7

I.4.1. Comparison entre le genre *Spirulina* et *Arthrospira* ……...8

I.4.2.Phylogénie moléculaire (*Arthrospira* et *Spirulina*)……...9

I.5. Morphologie et caractères généraux ……..10

I.5.1. Morphologie ……..10

I.5.2.Reproduction et Croissance ……11

I.5.3 Déplacement ……12

I.5.4. Répartition géographique…….12

I. 6. Facteurs physiologique pour la culture de la spiruline ……..14

I.6.1. la Température ……14

I .6.2. La lumière……...14

I.6.3.pH……..14
I.6.4.Salinité ……15
I.7. Le milieu de culture ……15
I.8. Composition chimique de la spiruline ……15
I.8.1.Glucides ……15
I.8.2. Composition en sels minéraux et oligo-éléments ……..16
I.8.3. Protéines…….16
I.8.4.Vitamines ……16
I.8.5.Acides nucléiques ……16
I.8.6. Pigments ……17
I.8.6.1. phycocyanine ……...17
I.8.6.2. La chlorophylle…….17
I.8.6.3. Les caroténoïdes……...17
I.8.7.Lipides ……17
I.9.Applications des microalgues ……....19
I.9.1. Domaine alimentaire…….19
I.9.2. Domaine pharmaceutique ……19
I.9.4. Domaine énergétique ……19
I.9.4.1. Production de bio-méthane……...20
I.9.4.2. Production de biocarburant ……..20
I.9.5. Domaine environnemental ……20

CHAPITRE II : Accumulation des lipides et production de biodiesel

II.1.Métabolisme des microalgues……..21
II.2.Les lipides chez les microalgues ……22
II.3.Le métabolisme lipidique chez les microalgues ……..22
II.4.L'utilisation des micro algues pour produire des biocarburants …….24
II.4.1.La teneur des lipides chez les microalgues ……...23
II.4.2.Critères de sélection des microalgues pour la production…….24
des algocarburants …
II.5.Conditions de stress stimulent l'accumulation des lipides …….24
II.5.1. Carence en azote……...25
II .5.2.Choc thermique ……25
II.5.3.Choc osmotique…….25

II.5.4.L'intensité lumineuse ……...26
II.6.7.Autres facteurs déterminants…….26
II.6.Les biocarburants ……...26
II. 6. 1. Définition ……..26
II.6.2.Les sources de biocarburants ……27
II.6.2.1. 1ère génération……..27
II.6.2.2ème génération……27
II.6.2.3ème génération……27
II.6.3. Les avantages et les inconvénients de biocarburants ……..27
II. 6. 3. 1. Les avantages …… 27
II. 6. 3. 2. Les inconvénients ……...29
II.7.Le biodiesel ……28
II. 7.1. intérêt de biodiesel ……28
II.7.2. Définition de biodiesel ……...29
II.7.3.La production de biodiesel ……..29
II.7.3.1. Les différentes étapes de production de biodiesel……...30

Deuxième partie : Expérimentation, résultats et discussion

CHAPITRE I : Matériel et méthodes

I.1. Matériel ……33
I.1.1 Matériel biologique ……..33
I.1.2. Matériels non biologiques…….33
I.2.Méthodes de travail ……...34
I.2.1 : Dispositif expérimental……34
I.2.2.Préparation de milieu de culture ……35
I.2.3.Préparation de l'inoculum ……..35
I.2.4.Examen microscopique ……..35
I.2.4.1. Examen à l'état frais ……35
I.2.4.2.Coloration de Gram ……...36
I. 2.5.Contrôle de l'évolution de biomasse……37
I.2.5.1 : Détermination du poids sec ……37
I.2.5.2.Calcule de la productivité volumique……38
I.2.5.3.la vitesse de croissance…… 38

I.2.6. Détermination de la chlorophylle a ……38
I.2.7.Détermination du taux de cendres ……39
I.2.8. Effet de l'azote sur l'accumulation des lipides ……40
I.2.9.Effet de la mélasse sur l'accumulation des lipides ……40
I.2.11.Effet de la lumière ……41
I.2.12.Effet de la Température ……41
I.2.10. L'extraction des lipides …….....42
I. 2.10.1. Préparation d'échantillon ……42
I. 2.10.2. L'extraction par soxhlet ……..43

CHAPITRE II : Résultats et discussion

II.1. Caractérisation morphologique de la spiruline ……..45
II.1.1 : Contrôle de la viabilité et de l'état physiologique d'*Arthrospira platensis* ……45
II.1.2 : Etude microscopique……45
II .1.2.1 : Observation microscopique à l'état frais ……45
II.1.2.2. : Observation microscopique après coloration ……47
II.2 : Cinétique de croissance ……47
II.2.1 : Estimation du poids sec (courbe étalon) ……...47
II.2.2.Densité optique et mesure de croissance dans la culture témoin ……48
II.2.3 .Evolution de la Concentration en biomasse dans le milieu ……..49
Zarrouk modifié (cas de stress azoté)
II.3. Etude physico-chimique ……..50
II. 3.1. Détermination du taux de cendres ……..50
II.3.2 : Détermination de taux de lipides ……51
II.3.3 : Effet de stress(carence en azote) sur la productivité ,…….51
l'accumulation des lipides , la teneur en chlorophylle a
II.3.4 : Effet de source de carbone organique (mélasse)…….53
sur la croissance ;taux de chlorophylle a

II. 3.4.1 : Influence de mélasse sur la croissance cellulaire …….53

II.3.4.2. Influence de mélasse sur la teneur en chlorophylle a ……..53

II.3.5. Effet de mélasse sur la teneur lipidique ……54

II. 3.6. Effet de la lumière sur le taux de chlorophylle a ……55

, productivité en biomasse

II.3.7. Effet de la lumière sur l'accumulation des lipides……...56

II.3. 8. Effect de la température sur la productivité et la teneur en chlorophylle a ……57

II.3.9. Effet de la température sur le taux des lipides ……....58

Conclusion et perspectives …….59

Résumé

Résumé :

Les microalgues présentent une source importante dans la production de biomasse, ce sont des microorganismes photosynthétiques qui attirent l'attention des scientifiques en raison de leurs nombreuses potentialités. La principale concerne la production des métabolites d'intérêt industriel et bioénergétique tels les acides gras polyinsaturés à grande chaîne (AGPI).

L'objectif de notre travail est d'évaluer l'influence de la composition de milieu de culture (milieu Zarrouk) et les fateurs physiques sur la productivité en biomasse , en chlorophylle a et en lipides chez la souche de microalgues *Arthrospira platensis* .En premier lieu on a cultivé la spiruline dans des conditions de stress (carence en azote) dans lequel on a varié les concentrations de source d'azote (NaNO3) afin d'étudier la productivité en biomasse, teneur en chlorophylle a et taux de production des lipides ;d'après les résultats obtenus on a constaté que la concentration 0.03g/l de NaNO3 est la mieux adaptée pour l'accumulation des lipides chez la spiruline tandis que la productivité de biomasse et le taux de chlorophylle a ralentissent en conditions de privation en azote .En deuxième lieu on a étudié l'effet d'une source de carbone (mélasse) sur la croissance algale et également l'accumulation des lipides chez la spiruline , les résultats ont montrés que la meilleure concentration de mélasse qui favorise une bonne accumulation des lipides et une bonne croissance est 1g/l ,ainsi on a vérifié l'impact des paramètres physiques (lumière et température) où la meilleure croissance est à T=35°C et une intensité lumineuse de 2500 Lux alors que pour l'accumulation des lipides 2500 Lux et 30°C sont les plus favorables .

Mots clés :Biodiesel, *Arthospira platensis* , carence en azote ,mélasse ,Lipides ,paramètres physiques .

Résumé

Abstract:

Microalgae are an important source in the production of biomass, they are photosynthetic microorganisms that attract the scientist's attention because of their many potentialities. The main one is the production of metabolites of bioenergetics and industrial interest such as polyunsaturated fatty acids (PUFA).

The objective of our work is to evaluate the influence of the composition of medium of culture (medium Zarrouk) and the physical eaters on the productivity in biomass, in chlorophyll a and in lipids in the microalgae strain *Arthrospira platensis*. Spirulina was cultivated under stress conditions (nitrogen deficiency) in which nitrogen source concentrations ($NaNO_3$) were varied to study biomass productivity, chlorophyll a content and metabolite production rate. secondary (lipids), according to the results obtained it was found that the concentration 0.03g / l of $NaNO_3$ is the best adapted for the accumulation of lipids in spirulina while the productivity of biomass and the rate of chlorophyll has slowed in Nitrogen deprivation conditions. Secondly, the effect of a carbon source (molasses) on algal growth and also the accumulation of lipids in the spirulina, the results showed that the best concentration of molasses that promotes good lipid accumulation and growth is 1g / l, so we checked the impact of the physical parameters (light and temperature) where the best growth is at T = 35 ° C and a luminous intensity of 2500 Lux whereas for the accumulation of 2500 Lux and 30 ° C lipids are the most favorable.

Key words : Biodiesel ,*Arthrospira platensis* , nitrogen deficiency ,molasses , physical parameters

Résumé

الملخص:

الطحالب المجهرية هي مصدر مهم للكتلة الحيوية ، فهي كائنات دقيقة ضوئية التغذية ما جذب انتباه العلماء بسبب العديد من الإمكانات. وأهمها إنتاج الأيضات ذات الأهمية العلاجية أو الصناعية مثل الأحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة (PUFA) لإنتاج الطاقة دون إطلاق غازات ، والأصباغ ، والسكريات ، والفيتامينات. لكن الطحالب المجهرية يمكن استخدامها أيضًا الهدف من عملنا هو تقييم تأثير تكوين وسط الاستزراع (وسط زروق) والعوامل الفيزيائية على الدفيئة (إنتاج الديزل الحيوي) إنتاجية الكتلة الحيوية والكلوروفيل أ والدهون في سلالة الطحالب الدقيقة ارتروسبيرا بلاتنسيس.

أولاً ، قمنا بزراعة سبيرولينا في ظروف الإجهاد (نقص النيتروجين) حيث قمنا بتنويع تركيزات مصدر النيتروجين ($NaNO_3$) من أجل دراسة معدل إنتاج المستقلبات الثانوية (الدهون) ، الكلوروفيل وإنتاجية الكتلة الحيوية للطحالب ،وفقًا للنتائج التي تم الحصول عليها ، وجد أن تركيز 0.03 جم / لتر من $NaNO_3$ هو الأكثر تكيفًا لتراكم الدهون في سبيرولينا بينما إنتاجية الكتلة الحيوية ومعدل الكلوروفيل تباطأ في ظروف نقص النيتروجين ، وفي المقام الثاني درسنا تأثير إضافة مصدر الكربون (العسل الأسود) على نمو الطحالب وكذلك تراكم الدهون في سبيرولينا. أظهرت النتائج أن أفضل تركيز من العسل الأسود الذي يسبب تراكمًا جيدًا للدهون ونموًا جيدًا للطحالب هو 1 جم / لتر ، ونتيجة لذلك فإننا قمنا بفحص تأثير العوامل الفيزيائية (الضوء ودرجة الحرارة) حيث يكون أفضل نمو عند درجة حرارة35 درجة مئوية وشدة اضاء ة2500 لوكس في حين أن درجة حرارة30 درجة مئوية وشدة إضاءة 2500 هما الأكثر ملائمة لتراكم الدهون .

الكلمات المفتاحية

Arthrospira platensis -الديزل الحيوي –الاحماض الدهنية- نقص النيتروجين-العسل الاسود-العوامل الفيزيائية

Résumé

Introduction

Introduction :

La consommation des énergies fossiles courantes a générée des problèmes environnementaux causés par les rejets anthropiques de gaz à effet de serre. Cela augmente l'intérêt des chercheurs pour développer de nouvelles technologies pour l'énergie propre grâce à l'utilisation de l'énergie renouvelable. Les microorganismes photosynthétiques comprend les microalgues et cyanobactéries qui ont le potentiel de devenir des convertisseurs photochimiques industriels, et de production de bioénergie à cause de leur capacité de produire des composés à hautes valeurs et d'intérêt énergétique comme : les lipides,l'hydrogène, de glucides et de protéines **(ZIGHMI.S.2017).** En effet ces microorganismes uilisent la lumière comme source d'énergie pour fixer le dioxyde de carbone (CO2),ils se trouvent en abondance dans les milieux aquatiques (océans, rivières, lacs, etc.). Comme chez les végétaux terrestres, certaines espèces peuvent accumuler, dans certaines circonstances, le carbone absorbé sous forme de lipides (principalement triglycérides), ce qui permet d'envisager d'utiliser ces microorganismes pour produire des biocarburants. **(Cadoret et Bernard ,2008)**

Les biocarburants visent à additionner ou substituer les carburants issus du pétrole. Ils sont une alternative durable aux énergies fossiles puisqu'ils sont renouvelables et moins toxiques pour l'environnement. En effet, la biomasse issue des microalgues est convertible via des transformations chimiques ou enzymatiques en biodiesel ou bioéthanol. La quasi-totalité de la biomasse peut être transformée en énergie de transport. Les lipides converties en biodiesel et sont incorporées au gazole, et le reste de la biomasse pourra donner du bioéthanol. La production de biocarburant d'origine algale présente de nombreux avantages qui ne s'arrêtent pas seulement au remplacement du pétrole comme énergie de transport **(f. lohézice dévéhat.2012)**

Pour croitre, les microalgues ont de nombreux besoins, les facteurs physiques les plus importants sont une source d'énergie, généralement la lumière et une température optimale. Et les facteurs chimiques sont la concentration disponible en dioxyde de carbone et un apport en macronutriment (azote et phosphate) et en oligo-éléments **(Wolfgang, 1994).** Ces microorganismes ont la capacité de pouvoir réagir à un changement de leur environnement en modifiant leurs voies métaboliques. En effet, des conditions de carence en azote sont connues pour stimuler la synthèse de lipides **(Cadoret et Bernard, 2008).** Ces conditions de carence ne doivent toutefois pas être maintenues trop longtemps puisqu'elles peuvent éventuellement entraîner une consommation des lipides synthétisés.

L’objectif de la présente étude est d’optimiser la composition du milieu de culture en variant les concentrations en azote dans le but de mettre la souche *Arhthrospira platensis* à un stress ce qui est traduit par la production importante des lipides Pour ce faire, nous avons tout d'abord déterminé les meilleures conditions afin de favoriser la productivité en biomasse et en lipides . Ensuite, nous avons cultivé la spiruline en conditions de mixotrophie afin de d’optimiser la meilleure concentration de source de carbone (mélasse) additionnée au milieu de culture qui favorisent une bonne productivité de biomasse et un bon taux des lipides accumulés et également l’effet des paramètres physiques (lumière et température) sur la spiruline et sa réponse aux stress .

Première partie
Synthèse bibliographique

CHAPITRE I : Généralités sur la spiruline

I.1. Origine de la spiruline: découverte et histoire

La spiruline est une cyanobactérie spiralée de couleur bleue-verte photo-autotrophe. C'est un organisme procaryote qui partage avec les plantes la capacité d'effectuer de la photosynthèse. À partir de composés minéraux, d'eau, et de l'énergie lumineuse captée grâce à leur chlorophylle, elles transforment le gaz carbonique et dégagent l'oxygène **(Who, 1999).** Il est admis par la communauté scientifique que l'apparition des cyanobactéries date de 3,5 milliards d'années, constituant ainsi les plus anciennes formes de vie sur terre. Toutefois, de récentes études, combinant des données paléo biologiques et des comparaisons phylogénétiques, datent l'apparition de ces dernières à la fin de l'archéen. Il y a 2,7 milliards d'années. Ce qui fait des cyanobactéries, les plus anciennes formes de vie sur terre **(Bernard, 2014).**

A la période précambrienne (2,5- 0,5 milliards d'années), les cyanobactéries ont constitué l'essentiel de la biomasse et ont alors permis un accroissement du taux d'oxygène et une diminution du taux de CO_2de l'atmosphère terrestre. Un héritage vivant de cette « Ère des cyanobactéries » est constitué par les stromatolithes en Australie **(Bernard, 2014).**
Elles constituent aussi le socle de la vie dans les océans puisqu'elles sont à l'origine de la grande diversité du phytoplancton. Elles résistent aux conditions les plus extrêmes notamment grâce à leur capacité à se rétracter en un agrégat de plusieurs milliers de filaments lorsque les conditions de température ou d'hydratation sont défavorables, elles conservent au centre de leurs capsules un minimum d'humidité nécessaire à leur survie dans l'attente d'une amélioration des conditions extérieures : on parle alors d'état de dormance **(Lavoie *et al.*, 2007; Vidalo, 2008).** Elles existent toujours de nos jours et jouent un rôle dans le maintien de l'équilibre des proportions entre le gaz carbonique et l'oxygène **(Mollo & Noury, 2013)**

I.2. Histoire de la spiruline

Les algues sont au menu des humains depuis la nuit des temps. Elles sont un aliment de base en Chine et au Japon dès la préhistoire. En Europe pendant l'antiquité, les algues sont utilisées comme aliments pour le bétail, colorants et médicaments contre les vers parasitaires **(Vidalo, 2008).**

Il existe près de 1500 espèces « d'algues bleues » dont 36 comestibles. Parmi elles, la spiruline est consommée des deux côtés de l'atlantique par *les Kanembous* du Tchad et par les Aztèques depuis des temps immémoriaux.

Au XV^{ème} siècle

Sur les rives du lac Tchad, le vent pousse les algues vers le rivage où elles forment un épais tapis de verdure récolté par les *Kanembous*. Récoltée et transformée en galette baptisée le *dihé* et est vendue sur le marché local. **(Gantar & Svirčev, 2008).**

Au XVI^{ème} siècle

A leur arrivée dans la vallée du Mexique, les conquistadors espagnols découvrent « une nouvelle nourriture » que les Aztèques appelaient le *tecuitlat* signifiant *« excrément de pierre »* parce qu'ils pensaient qu'il était produit par les minéraux. Récolté à l'aide de filets très fins à la surface du lac Texcoco, il était ensuite transformé en gâteaux d'une couleur bleu-vert **(Habib *et al.*, 2008).**

Dans les années 1960 **(Cruchot ,2008)** Leonard et son confrère P analysent le *dihé* et déterminent la spiruline confirmant ainsi le rapport de Dangeard. C'est ainsi que l'Institut Français du Pétrole (IFP), par l'intermédiaire de l'un de ses membres G. Clément, a lancé des études sur cette fameuse « algue ». Grâce à cet institut, la France a pu devenir pionnière en ce qui concerne l'étude de la spiruline. La spiruline sera redécouverte accidentellement par un ingénieur Français Hubert Durand Chastel qui arrive au Mexique pour prendre la direction de Sosa Texcoco, une unité de production de carbonate de soude. La matière première, la saumure, est extraite des sédiments du lac Texcoco. L'un des problèmes de l'exploitation est une matière organique qui perturbe la cristallisation des carbonates. Considérée comme une nuisance, elle est brûlée avec les ordures. C'est en assistant en 1967 à une conférence sur la spiruline au cours d'un congrès sur le pétrole à Mexico, et suite aux publications de Max Yves Brandily, qu'il fait le rapprochement avec cette substance qui le gênait dans sa production. Il débutera la culture d'*Arthrospira maxima* en 1968 et sa commercialisation se fera en 1976.

L'industrialisation de la culture de spiruline

La première expérience industrielle a lieu au Mexique avec Hubert Durand Chastel par le biais de la société Sosa Texcoco. La spiruline sèche arrivera sur les étagères des magasins de santé Américains en 1979 **(Vidalo, 2008).**

L'usine du Mexique fermera ses portes mais la relève sera assurée par l'entreprise *Earthrise Spirulina Company* aujourd'hui leader mondial sur le marché de la spiruline **(Vidalo, 2008).** En 1984, c'est au tour de la Chine de se lancer dans la production de spiruline à l'état naturel (dans le lac Chenghai) **(Fox, 1999).**

D'autres exploitations s'ensuivront un peu partout dans le monde. Grace aux progrès faits sur les techniques de culture, l'Europe est entrée dans la course et les productions à petite échelle se développent dans les pays en voie de développement **(Vidalo, 2008)**

I.3. Caractéristiques de la spiruline

I.3.1. Confusions générales liées à la spiruline

Le terme de spiruline : Les différentes confusions faites par rapport à l'emploi du terme spiruline sont regroupées dans le tableau ci-contre :

Tableau I.1 : Confusions liées au terme de spiruline **(Antenna ,2017)**

Spiruline	***Spirulina***	***Arthrospira***
- Terme vernaculaire générique regroupant toutes les spirulines. - En vente sur le marché (*Spirulina* non comestible et *Arthrospira* comestible). -Nom commercial **francophone** de la cyanobactérie appartenant au genre *Arthrospira.*	- Nom scientifique et taxonomique d'une autre cyanobactérie qui est très éloignée du genre *Arthrospira*. - du genre *Arthrospira* qui n'est pas utilisé dans le cadre de l'alimentation.	-Nom scientifique et taxonomique d'un groupe de cyanobactéries auxquelles appartient la spiruline utilisée dans le cadre de l'alimentation.

I.2.3.Caractéristiques communes de spiruline aux algues et aux bactéries

La spiruline est un procaryote gram négatif appartenant aux cyanobactéries. Même si les cyanobactéries possèdent des caractéristiques propres aux algues, il s'agit en réalité de bactéries

Les cyanobactéries se rapprochent des algues et des bactéries par certaines caractéristiques communes, présentées dans le tableau ci-dessous **(Bernard, 2014).**

Tableau I.2 : Caractéristiques communes des cyanobactéries aux algues et aux bactéries **(Bernard, 2014).**

Algues	**Bactéries**
Chlorophylle a Deux photosystèmes : I et II Photosynthèse : production d'O_2 Pigments synthétiques :Phycobiliproteines	Absence de membrane nucléaire Absence de mitochondries Absence de réticulum endoplasmique et dictyosome. Paroi cellulaire Gram- :Muréine

I.3.2. Classification de la spiruline

I.3.2.1.Histoire de la classification

La spiruline a été décrite pour la première fois par Wittrock et Nordsted en 1844 sous le nom de

Spirulina jenneri plantensis Nordsted **(Vonshak, 1997).**

En 1960, la distinction entre les procaryotes et les eucaryotes est établie. Elle se base sur la différenciation d'organisation cellulaire. En 1962 Stanier et ses collaborateurs constatèrent que cette « algue bleue verte » était dépourvue de compartiments cellulaires. Elle fait donc partie des procaryotes. Ils proposèrent de désigner ce microorganisme « cyanobactérie », avec un préfixe d'origine Grec « *cyano, cyan* » du nom du pigment bleu la phycocyanine qui la compose **(Nicoletti, 2016).** Cette nouvelle désignation est acceptée et figure pour la première fois au **« Bergey's Manual of Determinative Bacteriology » en 1974 (Vonshak, 1997).**

I.3.2.2.Systématique de la spiruline

Tableau I.3 : Position taxonomique (**Ripley Fox 1999**).

Règne	Monera
Sous règne	Prokaryota
Phylum	Cyanobacteria
Classe	Cyanophyceae
Ordre	Nostocales
Famille	Oscillatoriceae
Genre	Arthrospira
Espèce	*Arthrospira platensis*

I.3.3. Comparison entre le genre *Spirulina* et *Arthrospira*

Suivant les auteurs, les genres *Arthrospira* ou *Spirulina* sont proposés pour désigner la spiruline :

-*Spirulina* (de Turpin) représentant une forme aseptée.
-*Arthrospira* (de Stizenberger) représentant une forme avec un septum visible.
A cela s'ajoutent des différences morpho-anatomiques présentées dans le tableau ci-dessous :

Tableau I.4 : Comparaisons morpho-anatomiques des genres *Spirulina* et *Arthrospira* modifié **(Sguera et références citées , 2008)**

	Arthrospira	***Spirulina***
Trichomes	Hélice ouverte	Hélice presque fermé
Paroi cellulaire	Visibles si les vacuoles ne sont pas nombreuses	Difficilement visibles (gaine non prononcée)
Taille et spécificité des cellules	-6 à12 µm de largeur -Possible constructions entre cellules adjacentes	-2 à 4 µm de largeur -Peu ou pas de constructions entre cellules adjacentes
Mobilité	Rotation	Permanente par rotation
Reproduction	Scission simple : fragmentation du trichome en hormogonies à	Scission simple : fragmentation du trichome

	partir des cellules necridiques Toutes les cellules se divisent sauf les cellules apicales	en hormogonies(sans les cellules nécridiques) -Toutes les cellules se divisent.
Génome	ADN :43% de G+C	ADN : 44à53%de G+C
Représentation		

I.3.4. Phylogénie moléculaire (*Arthrospira* et *Spirulina*)

Pour l'identification des cyanobactéries 40 à 100 gènes dans le génome peuvent être utilisés comme des marqueurs phylogénétiques. Un des gènes les plus instructifs est le gène 16S rRNA ; car il est universellement présent dans les cyanobactéries et à une fonction conservée.

Des études phylogénétiques utilisant des séquences du gène 16S rRNA ont montré que beaucoup de genre de cyanobactéries unicellulaires filamenteuses non hétérocystées sont probablement polyphylétiques et ne peuvent pas être regroupés comme un taxon naturelle, alors que les genres hétérocystés forme un groupe monophylétique **(Ballot, 2004).**

La différentiation du genre *Arthrospira* des autres genres surtout le genre *Spirulina* n'a pas était toujours évidente, en raison de l'incorrecte unification des deux genres par Geitler (1932). Plusieurs études basées sur des caractères phénotypiques comme : paramètres de l'hélice (épaisseur, longueur), taille du trichome, paroi cellulaire, structure du membrane cellulaire, vésicules de gaz… etc., ont montré l'existence de différences entre les deux genres mentionnés précédemment **(Desikachary, 1959 ; Hindak, 1985 ; Guglielmi *et al.*, 1993 ;Tomaselli, 1997).** En plus des analyses génétiques plus récentes basées sur le gène 16S rRNA réalisées sur deux souches de *Arthrospira* (PCC 7345 et PCC 8005) en comparaison avec une autre souche du genre *Spirulina*(PCC 6313) (Ballot, 2004), ont révélé que le genre *Arthrospira* est très éloigné du genre *Spirulina* **(Nelissen *et al.*, 1994 ; Manen et Falquet 2002 ; Litvaitis, 2002)** et la séparation entre ces deux genres a été acceptée dans le *Bergey's Manual of Bacteriology* **(Castenholz, 2001)** . Il est important de préciser cette confusion car le genre *Arthrospira* est largement commercialisé sous le nom de 'Spirulina' comme supplément alimentaire pour les humains et les animaux

(Muhling *et al.*, 2006).D'autres études basées toujours sur le gène 16S rRNA réalisées sur les souches *Arthrospira fusiformis et Arthrospira maxima*, montrent une ressemblance à 100 ٪ . Une autre ressemblance de 99.7% entre deux autres souches d'*Arthrospira* (PCC 7345 et PCC 8005). D'après Castenholz *et al.*,.(2001) de telles hautes similitudes font que toutes les souches du genre *Arthrospira* ne sont probablement que des représentants d'une seule espèce **(Ballot, 2004)** et sans doute parler de variétés d'une même espèce dont le nom scientifique est *Arthrospira platensis* **(Falquet, 1996).**

I.4. Morphologie et caractères généraux

I.4.1. Morphologie

La spiruline est une cyanobactérie appartenant aux bactéries Gram négatif et pouvant être unicellulaire ou pluricellulaire de grande taille et de forme hélicoïdale spiralée, sa longueur moyenne est de 250µ quand elle possède 7 spires. Elle est composée de filaments mobiles (de 10 à 12 µm de diamètre) non ramifiés et enroulés à l'origine de son appellation : « spiruline » du latin « *spira »* qui signifie enroulement en spirales généralement en 6 ou 7 spires, qui ressemble à un minuscule ressort à boudin , d'où le nom de «Spiruline» **(Geitler.,1932) (Jarisoa, 2005).**

Plusieurs facteurs environnementaux peuvent influencer l'orientation de l'hélice. Cette forme hélicoïdale typique lui permet de se déplacer dans l'eau en adoptant le mouvement d'une vis, à une vitesse de 5 µm par seconde. On parle alors de déplacement par motilité **(Charpy *et al.*, 2008).**On trouve cependant des spirulines ondulées et droites, cette particularité étant en relation directe avec les conditions écologiques rencontrées dans leurs habitats.

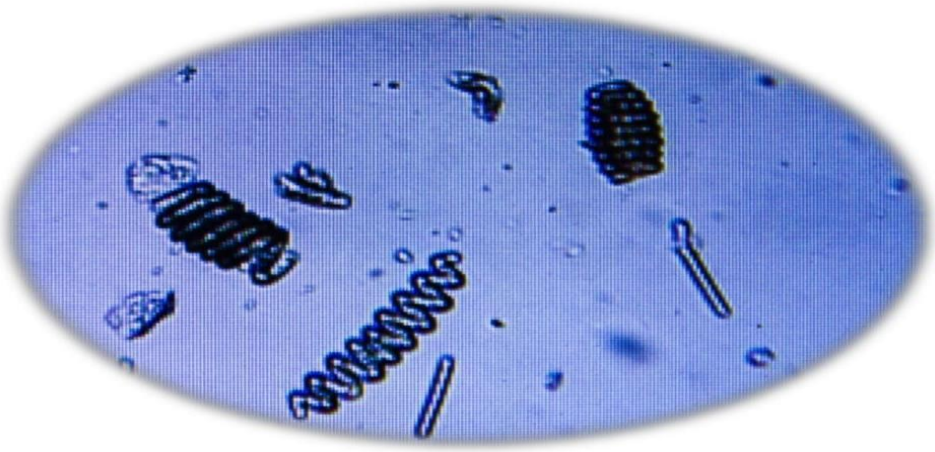


Figure I.1 : Observation au microscope optique de souches droites et spiralées d'*Arthrospira* provenant du Burkina Faso **(Ahounou,2017)**

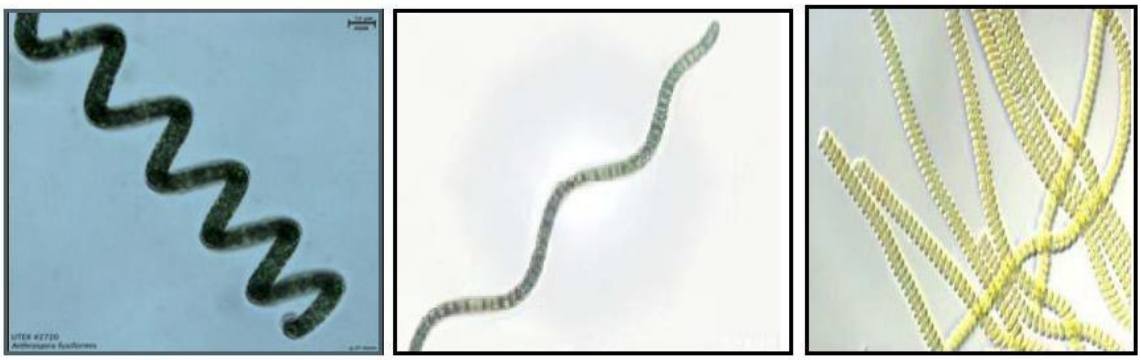


Figure I.2 : Différentes formes prises par la Spiruline. A = Forme spiralée (*Arthrospira fusiformis*) B= Forme ondulée (*Spirulina maxima*) C = Form droit (*Arthrospira platensis).* **(Muhling et *al.*2003)**

I.4.2. Reproduction et Croissance

La spiruline se reproduit par division binaire à l'instar de la majorité des cyanobactéries filamenteuses. Ainsi au cours de la reproduction asexuée, les trichomes de la spiruline forment des hormogonies par la fragmentation ; les cellules se divisent perpendiculairement à l'horizontal. La croissance de la spiruline est obtenue pour une température de 34 à 40°C, avec une population dense, un ensoleillement suffisant, et un pH de 8,5 à 10,5. Les éléments nutritifs essentiels doivent être en quantité satisfaisante. **(Fox, 1999).**

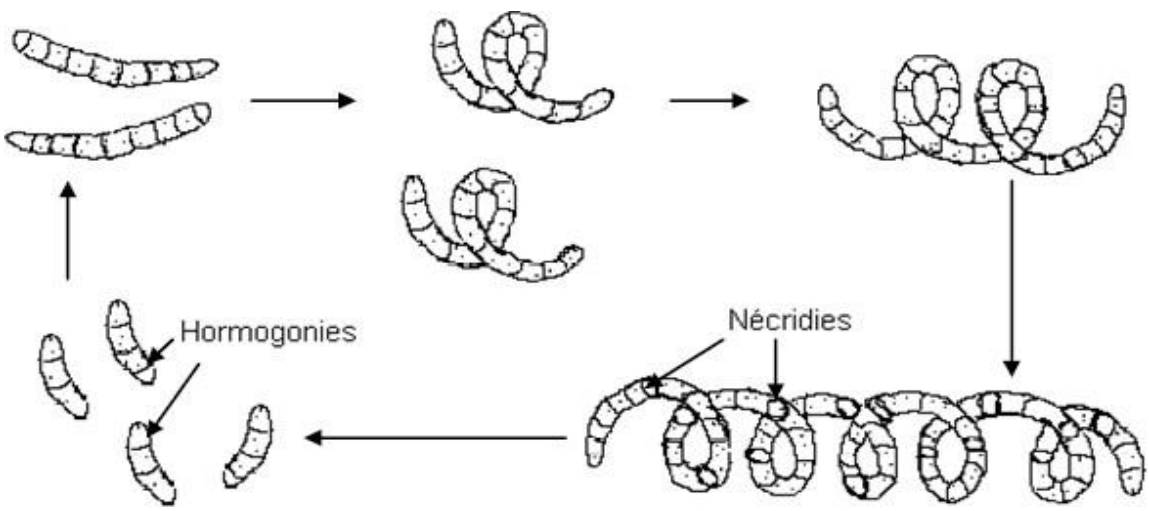


Figure I.3 : Cycle biologique de la Spiruline **(Balloni et *al.* 1980. Ravelo ,2001)**

I.5.3 Déplacement

La spiruline est capable d'effectuer deux types de déplacement : la **motilité** et la **flottabilité**, Le trichome exerce un mouvement oscillatoire, de forme hélicoïdale, en rotation autour du grand axe. La spiruline peut donc évoluer dans l'eau en se vissant ; ce déplacement s'effectue à la vitesse de 5µm par seconde. La microscopie électronique a permis de comprendre la motilité des filaments : cette technique met en évidence l'existence de *fimbriae* de 2 à 10 nm de diamètre et 1 à 2 µm de longueur ; ces filaments tubulaires dépassent de minuscules pores situés sur le pourtour des extrémités de la cellule. Les *fimbriae* sont aplatis contre la paroi cellulaire externe et pointent dans la même direction. Comme des rameurs sur une galère, ils propulsent le filament d'arrière en avant . **(Doumenge F,1993).**

La spiruline peut également fabriquer des vésicules de gaz d'environ 70 nm de long et 10 nm de diamètre, faites d'une chaîne de protéines tissées. Ces vésicules ressemblent à des tubes creux cylindriques comportant des capuchons coniques. Elles se trouvent habituellement près des parois terminales des cellules et sont empilées les unes sur les autres. Elles se forment et se remplissent de gaz lorsque la lumière du soleil apparaît : tels des ballons dirigeables, elles permettent au filament de spiruline de remonter en surface pour recevoir la lumière et ainsi commencer la photosynthèse **(Fox ,1999).** Ces deux méthodes de locomotion permettent à la spiruline de se protéger elle-même contre une overdose mortelle de soleil. Les mouvements de circulation de bas en haut puis de haut en bas lui permettent d'absorber la juste quantité de lumière dont elle a besoin.

I.5.4. Répartition géographique

On distingue le genre *Arthrospira* des autres cyanobactéries par le milieu naturel dans lequel il se développe. En effet, la spiruline se développe préférentiellement dans des eaux douces et chaudes, alcalines (pH 8 - 11,5) et minéralisées (nitrate, phosphates, fer) riches en carbonate de sodium (Na_2CO_3) ou bicarbonate de sodium ($NaHCO_3$) excluant ainsi la plupart des autres microorganismes. Plus communément, on la retrouve dans les eaux saumâtres, ainsi que dans les lacs salins de régions tropicales et semi-tropicales.

Son caractère thermophile et ses besoins importants en lumière limitent son aire de répartition à une bande intertropicale située entre 35° de latitude Nord et 35° de latitude Sud. On la retrouve ainsi dans les lacs alcalins en Afrique, en Amérique latine, et en Asie du sud. Il s'agit d'un

organisme cosmopolite mais il est beaucoup moins abondant en Amérique du Nord et en Europe **(Charpy *et al.*, 2008).** Le tableau ci-dessous regroupe quelques sites où la spiruline est retrouvée naturellement :

Tableau I.5 : Tableau de la distribution géographique naturelle de *Spirulina platensis* **(Sguera et références citées, 2008).**

Afrique	
Tchad	La région du Kanem : les lacs Latir, Ouna, Borkou, Katam, Yoan, Leyla, Bodou, Rombou, Moro, Mombolo, Liwa, Iseirom, Ounianga kebir
Ethiopie	Lacs Aranguadi, Lesougouta, Nakourou, Chiltu, Navasha, Rodolphe
Kenya	Lacs Nakuru, Elmenteita, Cratère, Natron
Madagascar	Beaucoup de petits lacs près de Toliara (Nguyen Kim Ngam.,1994)
Asie	
Inde	Lac Lonar (Damle.,1978), un réservoir près de Madurai (Bai.,1984), un réservoir près de Calcutta (Biswas), Lac Nagpur (Pargaonkar.,1981)
Sri Lanka	Lac Beira
Amérique	
Pérou	Lac Huacachina, près d'ica, maintenantremplid'eau douce, il ne contient plus de spiruline. Lac Orovilca (Lopez.,1980), maintenant asséché. Lac Ventanilla, sur la côte près de Lima (Figueroa.,1987) : on n'en trouve plus actuellement. Réservoir d'eau près de Paracas (Fuentes et al.,1993)

Mexique	Lac Texcoco (David.,1976), Lac Cratère (Durand-Chastel.,1990)
Europe	
France	Camargue (Planchon et al.,1994)

I.5. Facteurs physiologique pour la culture de la spiruline

Il existe trois facteurs essentiels déterminants pour la culture de la spiruline :

La température, la lumière et le pH.

I.5.1. la Température

Les premiers repères concernant les températures sont à peu près les mêmes que pour l'homme, 37°C : température idéale pour pousser la vitesse de croissance de la spiruline **(Falquet ,1999)**

Au-dessus de 43°C peut être mortel , en dessous, la vitesse de multiplication baisse , à 20°C la croissance est pratiquement stoppée la culture doit donc se situer entre ces deux températures **(Jourdan ,1999).**

I .6.2. La lumière

Les régions les plus ensoleillées seront les plus favorisées pour la culture de micro-algues y compris la spiruline.

Une très forte lumière (plein soleil) peut être dangereuse dans les cas suivants:

- une brusque illumination d'une culture froide (moins de 14°C à 15°C).
- une culture très chaude, (réchauffement).
- une culture très diluée (Secchi de plus de 6 cm).

On réduit volontairement la luminosité par ombrage si l'on désire freiner la croissance de la spiruline, ou si l'on se trouve dans l'un des trois cas précédents. **(Jourdan,2006).**

I.6.3.pH

Le matin, le pH sera le plus bas que le soir à cause du CO_2 libéré la nuit par la respiration.la photosynthèse augment le pH pendant le jour, car chaque mole de carbone (12grammes) fixée par les algues libère 1.196 moles (20.332 grammes) d'ions hydroxyles (OH^-) dans le milieu de culture.

La spiruline croit pour un pH de 8 à 11, avec un optimum à environ 9.5. Dans les lacs naturels le pH se stabilise à 10.5 grâce à la vitesse modérée d'absorbation du CO_2 atmosphérique. Comme nous l'avons vu, la photosynthèse libére des ions OH^-, ce qui augmente l'alcalinité et donc le pH en fin de journée. Dans une culture non enrichie artificiellement en CO_2 se combinent pour donner

un pH autour de 10.5. Un avantage de ce pH élevé est d'inhiber la croissance d'autres algues ou de protozoaires dans ce milieu.

Inconvénient: la croissance de la spiruline ralentit quand le pH mont **(Fox R D.,1999).**

I.6.4.Salinité

La spiruline peut être considérée comme une espèce à la fois halophile et très euryhaline, en milieu naturel les salinités tolérées vont de 8 PSU à 270 PSU **(Beadle.,1943).**

I.6.Le milieu de culture

Dans le cas de spiruline, la croissance optimale est obtenue pour une température de 34°à40°C, avec une population dense, un ensoleillement généreux, un pH de 8,5 à 10,5(moyenne 9,5) ; les éléments nutritifs essentiels doivent être en quantité suffisante. Une intensité lumineuse élevée sans agitation conduit à une photolyse, et une forte intensité lumineuse avec une forte agitation donne la croissance optimale **(Fox, 1999).**

Le milieu de culture contient des engrais pour assurer la croissance des spirulines : l'azote, le phosphore, le potassium sont les éléments classiques, mais le soufre, le magnésium, le calcium et le fer doivent aussi être ajoutés s'ils ne sont pas apportés en quantité suffisante par l'eau, le sel et les engrais. Une analyse préparatoire de l'eau et du sel est utile pour calculer la dose de Mg, Ca et Fer à ajouter car un excès de ces éléments est nocif **(Boudour, 2008).**

Les sources d'azote préférées des spirulines sont l'ammoniac et l'urée, mais ces produits sont toxiques au-delà d'une concentration limite à respecter impérativement, c'est pourquoi lors de la préparation du milieu de culture, utiliser un nitrate que l'on peut mettre à forte dose, constituant une réserve d'azote à long terme (Boudour., 2008), La source la plus facile à employer est le nitrate, de sodium ou de potassium ($NaNO_3$ OU KNO_3) **(Fox, 1999).**

I.7.Composition chimique de la spiruline

La spiruline est utilisée, en alimentation humaine, compte tenu de ses teneurs en protéines, vitamines, minéraux et acides gras non saturés. C'est l'ensemble de tous ses nombreux facteurs nutritifs qui en fait un aliment trés précieux. La composition chimique des spirulines est variable selon les conditions de culture. Les caractéristiques les plus intéressantes restent toujours présentes .

I.7.1. Glucides

Les glucides représentent 15 à 25 % du poids sec de l'algue. Les sucres simples et les polyols ne sont présents qu'en très faible quantité. Les glucides assimilables sont représentés par du rhamnosanne et du glucosanne aminés, respectivement environ 2 % et 10 %. On note aussi la présence de glycogène (0,5 %)

I.7.2. Composition en sels minéraux et oligo-éléments

La richesse de la spiruline en fer, dont la biodisponibilité est deux à trois fois supérieure à celle de la viande, se révèle très intéressante pour améliorer les anémies ferriprives liées aux malnutritions protéino-énergétiques .Calcium et phosphore sont présents à des taux comparables à ceux retrouvés dans le lait et dans des proportions qui excluent tout risque de décalcification par apport excessif de phosphore. La spiruline est aussi une bonne source de magnésium biodisponibles chez l'Homme .

I.7.3. Protéines

Selon les souches et les conditions de culture, la quantité en protéines d'*Arthrospira platensis* varie de 55 à 70 % du poids sec. La spiruline contient la plupart des acides amines et notamment tous les acides aminés essentiels constituant prés de 60% du poids total des protéines . La spiruline est caractérisée par un très fort taux de protéines pouvant atteindre jusqu'à 70 % du poids sec de l'algue. C'est l'aliment le plus riche en protéines connu à ce jour puisqu'elle en contient deux fois plus que le soja et trois plus que la viande.

I.7.4. Vitamines

La spiruline est très riche en vitamines du groupe B, notamment en vitamine B12 puisqu'elle en contient 4 fois plus que le foie de veau. D'autre part, elle se distingue par sa richesse en β-carotène (jusqu'à 80 % des caroténoïdes totaux). La vitamine E est retrouvée à des taux comparables aux germes de blé **,**viande ou le poisson l existe treize vitamines, 4 liposolubles (A, D, E, K) et 9 hydrosolubles (B1, B2, B5, B6, B12, …). La spiruline contient de nombreuses d'entres elles et spécialement des vitamines B dans des proportions optimales . Les vitamines constituent le principal facteur implique dans les propriétés biologiques des spirulines. Les vitamines identifiées en majorité chez *Spirulina platensis* sont (pour 100g de biomasse) : la vitamine C (42,0-195,3 mg), la vitamine B3 (0,6-5,3 mg), la vitamine B1 (0,8-15,4 mg), la vitamine B2 (0,2-0,9 mg), la vitamine B6 (0,3-4,0 mg), la vitamine B9 (0,2-0,6 mg) et la vitamine B12 (0,3-0,8 mg) . Les trois vitamines liposolubles trouvées chez la spiruline sont le β-carotène, précurseur de la vitamine A, la vitamine E et la vitamine B .

I.7.5. Acides nucléiques

Les acides nucléiques totaux représentent 4,2 à 6 % du poids sec de l'algue, et ce faible taux exclut tout risque d'excès d'acide urique chez les consommateurs réguliers de spiruline à la dose journalière recommandée à titre de complément alimentaire.

I.7.6. Pigments

I.7.5.1. La phycocyanine : vient du grec phyco signifiant algue et cyanine venant de la couleur cyan, et signifie bleu-vert, elle n'a pas d'odeur particulière et elle est non toxique et légèrement sucrée (15). C'est un pigment assez rare dans la nature qui absorbe la lumière dans une longueur de 610 à 650 nanomètres. Elle est représentée a environ à hauteur de 10 à 11% en moyenne dans la spiruline. Appréciée comme colorant bleu naturel dans l'industrie agroalimentaire, de nombreuses recherches sont en cours pour connaitre toutes ses propriétés. Sa structure particulière lui confère des propriétés antioxydants, antiradicalaires et détoxifiantes. La phycocyanine stimulerait également la production des globules rouges et des globules blancs **(Bensehaila, 2016).**

I.7.5.2. La chlorophylle :est un pigment essentiel de la photosynthèse puisqu'elle transforme l'énergie lumineuse en énergie chimique. Constituée d'un atome de magnésium en son centre, la chlorophylle est parfois comparée à l'hémoglobine qui possède quant à elle un atome de fer.
La spiruline en contient environ 1%, ce qui stimulerait les fonctions de presque tous les organes **(Bensehaila, 2016).**

I.7.5.3. Les caroténoïdes : sont des pigments non azotés dont la coloration varie du jaune au rouge, La plupart des caroténoïdes sont des provitamines A indispensables aux hommes et aux animaux. La spiruline en contient entre 20 et 25 fois plus que les carottes. La béta carotène représente 80% des caroténoïdes présents. Les caroténoïdes ont une action anti radicalaire. Ils participent également à la croissance et au développement de l'individu, ainsi qu'au maintien de la vision nocturne **(Bensehaila, 2016).**

I.7.6. Lipides

Outre leur rôle énergétique évident, les lipides présentent également un rôle structural contribuant au maintien de l'architecture cellulaire. Suivant le système d'extraction utilisé, la teneur des lipides totaux est comprise entre 4à17% du poids sec de la spiruline (Gutiérrez-Salmeán *et al.*, 2015). Cette fraction lipidique se caractérise par un bon équilibre acides gras saturés sur acides gras polyinsaturés. On retrouve 83% de fraction saponifiable et 17% de fraction insaponifiable dans les lipides **(Charpy *et al.*, 2008).**

-Fraction saponifiable « Acides gras » : La teneur en acides gras de la spiruline est comprise entre 4,9 à 5,7% de la matière sèche. Elle varie essentiellement suivant le milieu de culture **(Colla *et al.*, 2004).** Les pourcentages relatifs des principaux acides gras au sein de la spiruline se trouvent dans le tableau ci-contre.

Tableau I.5 : Tableau représentant le pourcentage des principaux acides gras de la spiruline modifiée **(Falquet et Hurni, 2006).**

Acide gras	% des Acides gras totaux
Palmitique (16 :0)	25-60
Stéarique (16 :1)	0.5-10
Oléique Oméga 6	5-16
Linoléique (18 :2)	10-30
AGL	8-40

La spiruline est considérée comme une très bonne source d'acide gamma-linolénique (AGL), d'acide linoléique, et d'acide oléique. Malgré les différents taux d'AGL obtenus suivant les échantillons, il est important de souligner sa présence, du fait de sa rareté dans les aliments courants elle est souvent retrouvée dans des huiles onéreuses d'onagre ou de pépins de cassis. La spiruline est l'une des sources contenant la plus grande quantité d'AGL représentant environs 20% des acides gras totaux. Cet acide gras est intéressant comme précurseur des prostaglandines, des leucotriènes, et des thromboxanes, médiateurs des réactions inflammatoires et immunitaires **(Gutiérrez-Salmeán *et al*., 2015).**

On note l'absence d'acide gras oméga 3 qui pourrait être compensé par l'apport de l'huile de noix, de colza, des poissons riches en oméga 3 permettant de pallier à un éventuel déséquilibre du ratio Ω6/Ω3.

Cette fraction saponifiable se compose aussi de plusieurs di-glycérides, de phosphatidylglycérol, et d'autres phospholipides indéfinis. Les triglycérides, la phosphatidyl choline, la phosphatidyléthanolamine et le phosphatidyl-inositol quand ils sont présents, ne le sont qu'en très faible quantité **(Charpy *et al.*, 2008).**

-Fraction insaponifiable

La fraction insaponifiable de la spiruline représente 1,1 à 1,3% de la matière sèche et environ 13% de la fraction lipidique totale. Elle est constituée de stérols, de terpènes, de paraffines, et de pigments **(Falquet & Hurni, 2006; Charpy *et al.*, 2008).**

La quantité de stérols (dont le cholestérol) retrouvée dans la spiruline est très faible, variant entre 0 à 0,015% de son poids sec. Les alcools terpéniques représentent 5 à 10% de l'insaponifiable.

Enfin, les hydrocarbures saturés (paraffines) représentent entre 0,1 et 0,3% de la spiruline sèche, avec majoritairement du n-heptadécane pouvant dans certaines conditions être toxique (notons qu'on en retrouve dans certaines levures alimentaires à hauteur de 0,1 à 0,5%) **(Charpy *et al.*, 2008).**

I.8. Applications des microalgues

Au vu de leur biodiversité et leurs propriétés biochimiques, les microalgues se révèlent être prometteuses pour de nombreuses applications tels que l'industrie pharmaceutique, agroalimentaire , l'environnement et les énergies renouvelables.

I.8.1. Domaine alimentaire

Les microalgues constituent un réel apport nutritif. Ces microorganismes sont utilisés dans 1'alimentation animale et humaine, et dans l'aquaculture **(Pulz *et al.*, 2004).** La biomasse peut être produite sous forme de poudre, tablettes, capsules, pastilles...

Les microalgues sont considérées comme une source potentielle d'acide gras polyinsaturé **(Jiang *et al.*, 1999),** destinée a 1'alimentation humaine et animale. Ces organismes sont susceptibles de synthétiser des AGPI.

Les microalgues ont un potentiel intéressant de production de pigments **(Lorenz et Cysewski, 2000),** les caroténoïdes sont de plus en plus employés dans l'industrie alimentaire, suite a la pression du consommateur et a l'augmentation des règlementations limitant l'utilisation des colorants artificiels **(Gordon and Bouernfeind, 1982).**

I.8.2. Domaine pharmaceutique

Au vu de leur grande diversité biochimique, les microalgues représente une source intéressante de molécules bioactives et de toxines utilisables dans le développement de nouveaux médicaments. Plusieurs études ont permis de mettre en évidence l'implication des microalgues dans le domaine pharmaceutique par 1'identification de nouvelles molécules naturelles **(Hoppe, 1979).**

I.8.3. Domaine cosmetique

Plusieurs espèces de microalgues sont exploitées industriellement dans le domaine cosmétique, principalement les deux espèces *Arthrospira* et *Chlorella* **(Stolz et Obermayer,2005).**

Des extraits d'algues, ayant une activité antioxydante, sont exploites sur le marche dans la fabrication des produits de soin capillaire, du visage et de la peau ainsi que dans les crèmes solaires **(Pulz *et al.*, 2004).**

I.8.4.Domaine énergétique

La valorisation de la biomasse algale peut se traduire par la production de bioénergie sous forme d'électricité et/ou de chaleur par combustion directe, ou sous forme de biométhane après méthanisation ou sous forme de biocarburant ou d'hydrogène. Cependant, cette valorisation ne sera concurrentielle qu'avec une forte productivité de biomasse, une possibilité de récolte mécanique simple et un cout de production plus réduit que les précèdes mettant en oeuvre d'autres types de biomasse **(Carlsson *et al.*, 2007).**

I.8.3.1. Production de bio-méthane

Production de bio-méthane à partir de la biomasse marine, avec un potentiel intéressant **(Chynoweth, 2002).** Cependant, des verrous techniques tels que 1'accessibilité des nutriments et les couts de production élevés sont limitant.

I.8.3.2. Production de biocarburant

Considérant le contexte mondial actuel (hausse du prix du pétrole, raréfaction des ressources fossiles, production de gaz a effet de serre...), il est intéressant de considérer les microalgues comme source de production de différents types de biocarburant : le bio-oil **(Miao *et al.*, 2004),** et le biodiesel **(Benzidane *et al.*,2017)**

- Production de bio-oil.
- Production de biodiesel.
- Production de bio-hydrogène

I.8.4. Domaine environnemental

Les principales applications environnementales sont le traitement des eaux usées et bien sur la consommation de CO_2comme méthode d'abattement de ce gaz à effet de serre.

- Traitement des eaux usées.
- Agriculture.

CHAPITRE II : Accumulation des lipides et production de biodiesel

II.1. Métabolisme des microalgues

Les algues sont des organismes autotrophes ou phototrophes, c'est-à-dire qu'elles utilisent la lumière (via la photosynthèse) et du carbone inorganique (CO_2) afin de produire de l'énergie sous forme d'ATP et du sucre pour assurer leur croissance. Toutefois, les algues ont la capacité de changer de mode trophique en fonction des variations des conditions de l'environnement elles se développent où (Tableau II.1).Elles peuvent passer d'un métabolisme à l'autre en fonction du milieu **(Chojuacha Katarzyna et *al* ,2004)** .

On peut distinguer deux autres types trophiques en plus de celui autotrophe: l'hétérotrophie et la mixotrophie. En l'absence de lumière, les algues en mode hétérotrophe utilisent dans ce cas une source de carbone organique dans le but de substituer la fixation de CO_2 par la respiration cellulaire.Elles vont donc consommer de l'oxygène.Enfn la mixotrophie ou photohétérotrophie est un mixte entre la phototrophie et l'hétérotrophie. Les microalgues utilisent le carbone organique et inorganique du milieu en présence de lumière pour subvenir à leurs besoins énergétiques. Elles vont donc utiliser concomitamment la respiration cellulaire et la photosynthèse **(Richmond et *al* ,2008)**

Tableau II.1: Les différents modes trophiques pouvant être utilisés par les microalgues

Modes trophiques	Les éléments fixés	Molécules générées	Voies métaboliques
Autotrophe	H_2O,CO_2, et sels minéraux	O_2 et Composés organiques	Photosynthèse
Hétérotrrophe	Matière organique et O_2	H_2O,CO_2, et composés Organiques	Respiration
Mixotrophe	H_2O,CO_2,O_2,Sels minéraux et matière organique	O_2 ,H_2O,CO_2et Composés organiques	Photosynthèse et Respiration

II.2. Les lipides chez les microalgues

Les microalgues et les cyanobactéries contiennent comme tous les organismes vivants, une fraction de lipides. En condition normale, ces teneurs restent faibles, et les lipides sont principalement constitués de phospholipides et de glycolipides difficilement utilisables dans un biocarburant. Chez certaines espèces, il est possible d'augmenter significativement la production de lipides par un stress. Les stress identifiés peuvent être de différentes natures **(Sheehan et *al.*, 1998).**

Les lipides présents dans les cellules algales peuvent être classifiés en deux grandes catégories, les lipides neutres et les lipides polaires. Les triglycérides (figureII.2), aussi appelés triacylglycérols (TAG) appartiennent à la première catégorie tandis que les phospholipides et glycolipides, constituants principaux de la membrane plasmique, font partie du second groupe.

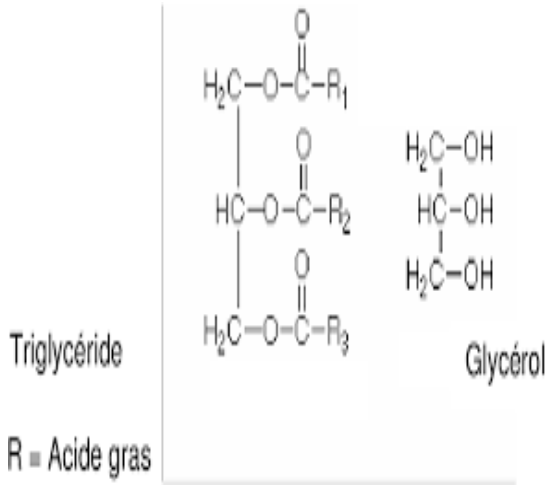


Figure II.1. : Un triglycéride

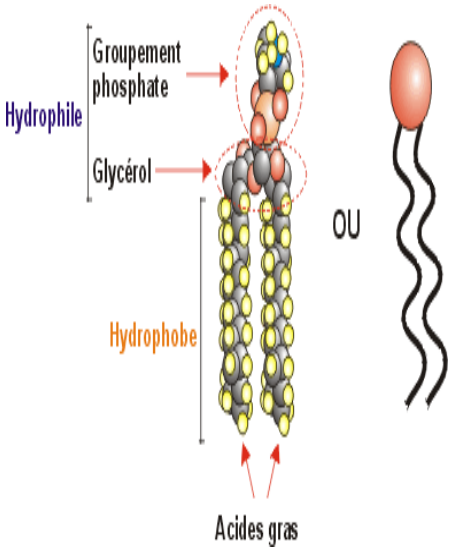


Figure II.2. : Un phospholipide

Ce sont les triglycérides, qui sont des substances de réserve et s'accumulent dans les vacuoles des cellules algales. En effet, les TAG ont un meilleur potentiel pour être transformés en biodiesel du fait de leur plus forte concentration en acide gras et de l'absence de groupement phosphate **(Pruvost et *al.*2005)** dans le cas des phospholipides (figure II.2.)

II.3. Le métabolisme lipidique chez les microalgues

La recherche sur le métabolisme lipidique chez les microalgues est relativement récente et elle s'appuie sur les données préexistantes obtenues chez les plantes terrestres. Les algues unicellulaires vivent dans des environnements très variés, ce qui peut expliquer la forte

diversité d'acides gras et de lipides d'une espèce à l'autre. D'une manière générale, les microalgues contiennent plus d'acide gras à longue chaine -(Very Long Chain Fatty Acid, VLCFA), c'est-à-dire avec des chaînes carbonées supérieures à 18 carbones. Elles sont également plus riches en acides gras insaturés comme l'acide arachidonique (20:4), eicosapentaénoïque (EPA, 20:5) et l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6) **(Harwood et Guschina 2009)**. Les microalgues produisent également des lipides polaires "atypiques" tels que les glycérolipides .

II.4.L'utilisation des microalgues pour produire des biocarburants

Au début des années 2000, devant l'augmentation du prix des carburants et face à une pénurie du pétrole, la production d'algo-carburant revient à l'ordre du jour. Les microalgues ont émergés comme l'une des sources les plus prometteuses pour la production de biodiesel. La culture de ces micro algues semble être un moyen prometteur afin de répondre aux besoins énergétiques futurs du fait de leur teneur en lipides élevée et de leurs productivités en biomasse élevées comparée avec d'autres organismes photosynthétiques (figureII.5).Lorsque elles sont cultivées dans des conditions dites « de stress », certaines espèces de micro-algues peuvent accumuler des taux importants de lipides et plus spécifiquement des triglycérides .

La spiruline est composé d'acide linolénique, linoléique et palmitique ainsi que l'acide oléique qui sont comparables à ceux que l'on trouve dans différentes graines oléagineuses telles que l'huile de soja et l'huile de palme qui ont été largement utilisés pour la production de biodiesel. Cela rend l'huile de spiruline attrayante et fait un candidat alternative intéressante à être transestérifier au biodiesel. **(Kate E. Baunillo,2012) .**



Figure II.3 : Productivité en huile des micro-algues par rapport à d'autres plantes oléagineuses

II.4.1.La teneur des lipides chez les microalgues

Les teneurs en lipides chez les microalgues peuvent atteindre 80% de la matière sèche .Ces conditions de fortes productivités ne peuvent toutefois pas être maintenues pendant de longues durées , elles conduisent le plus souvent à un arrêt de la croissance, puis, après un laps de te la productivité en lipide doit donc passer par un compromis entre croissance (donc sans carence) et production d'huile (avec un stress ralentissant la croissance) **(Metting, 1996).**Quelque exemples d'algues produisent sont présenté dans le(tableau II.2)

Tableau II.2:Productivité surfacique et teneur lipidique de différentes espèces de microalgues **(synthétisé à partir de Mata, 2010 ; Griffiths, 2009)**

	Chlorella sp.	***Spirulina platensis***	***Botryoccocus braunii***	***Haematoccocus pluvialis***	***Dunaliella salina***
Taux de croissence (g/m^2/jour)	1.61-25	1.5-51	3	10.2-36.4	1.6-38
Teneur lipidique (% matiere sèche)	18-57	4 à 17	25-75	25	6 à 25

II.4.2.Critères de sélection des microalgues pour la production des algocarburants

La sélection des microalgues se fait selon différents critères **(Day *et al*, 2012)** :

- La résistance au stress.
- La haute capacité de capture du dioxyde de carbone :l'efficacité photosynthétique.
- Le faible besoin en nutriments.
- La production de co-produits de grande valeur ajoutée.
- Un cycle de productivité rapide.
- La capacité de croissance dans de grands volumes.
- Un pouvoir calorifique élevé.

Le pouvoir calorifique des cellules est conditionné par la teneur en glucides, protéines et lipides. **(Scragg *et al,* 2002).**

II.5.Conditions de stress stimulent l'accumulation des lipides

En cas de stress, un mécanisme d'auto-défense se déclenche en faveur de la production de métabolites de réserve. Ce phénomène fait intervenir plusieurs paramètres et est devenu un

enjeu majeur de la recherche sur les micro-algues. **(Chisti, 2007 ; Goold *et al,* 2014)**

Certaines carences en nutriments, appliquées par l'homme sur la composition chimique de milieu de culture stimulent la production de métabolites de réserve **(Schnurr *et al,* 2013 ; Sheehan *et al,* 1998).**

II.5.1.Carence en azote

Une carence en azote (N) provoquée dans le milieu de culture déséquilibre la proportion d'azote et de carbone habituellement absorbée par la microalgue dans ses cellules. Cette diminution soudaine a pour conséquence de ralentir la synthèse de protéines au profit de l'augmentation des lipides **(Falkowski et Raven, 2007).**La carence en azote ralenti la photosynthèse progressivement entrainant une fixation excédentaire d'énergie et de carbone Elle modifie la répartition des acides gras, leur degrée d'insaturation décroissant en réponse à la diminution des acides gras polyinsaturés au profit d'acides gras saturés, et particulièrement de l'acide oléique **(Breuer et al., 2012).**

II .5.2.Choc thermique

Un choc thermique est un écart thermique par rapport à la température normale de culture dans le photobioréacteur, appliqué à la biomasse pendant un temps donné, de façon à modifier l'instauration des acides gras des lipides. Une diminution de température variant entre 4 et 15°C en dessous de la température optimale, permet d'obtenir des lipides plus insaturés, alors qu'une augmentation de température au-delà de 30°C permet d'obtenir des lipides moins insaturés. **(Thepenier *et al,* 1993).** Une augmentation des lipides totaux a pu être observée en réponse à une diminution de la température, ainsi qu'aux températures extrêmes **(Ras, Steyer, & Bernard, 2013 ; Gigova, Ivanova, Gacheva, Andreeva, & Furnadzhieva, 2012 ; Van Wagenen et al., 2012 ; Converti, Casazza, Ortiz, 32 Perego, & Del Borghi, 2009 ; Thompson, Guo, & Harrison, 1992).** Le degré d'insaturation des acides gras augmente avec la température pour permettre à la cellule de conserver une bonne fluidité membranaire, siège de nombreuses réactions métaboliques **(Susan M Renaud, Zhou, & Parry, 1995 ; Susan M Renaud, Thinh, Lambrinidis, & Parry, 2002 ; Thompson, Guo, Harrison, & Whyte, 1992).**

II.5.3.Choc osmotique

Une augmentation de la salinité dans un milieu aqueux constitue un choc osmotique pour des micro-algues. Ainsi la production cellulaire d'acides gras totaux augmente avec la quantité de sel, Par exemple *Chlorococcum sp* voit sa teneur en lipides multipliée par trois pour une augmentation de la salinité de 0 à 2% de NaCl **(Harwati, Willke, & Vorlop, 2012).**

Le glycérol intracellulaire sert à équilibrer osmotiquement le sel extracellulaire. De ce fait, la

micro-algue répond au stress osmotique en privilégiant la production de glycérol.

II .5.4.L'intensité lumineuse

La lumière a un effet considérable sur l'activité photosynthétique, la teneur en lipides et leur saturation. De fortes intensités lumineuses induisent la synthèse et le stockage des lipides neutres (la synthèse des acides gras jouerait le rôle d'un flux à électrons en cas de stress photo-oxydatif) ainsi qu'une augmentation de la proportion d'acides gras saturés et mono-insaturés **(Hu 2008).**

Le passage d'une faible à une forte intensité lumineuse provoque un accroissement de plus de 40% des lipides totaux **(Guihéneuf et al. 2010),** ainsi qu'une forte augmentation des lipides neutres et une diminution des lipides membranaires **(Gordillo, Goutx, Figueroa, & Niell, 1998 ; Hu et al., 2008).** Cela favorise également la teneur en acides gras saturés aux dépens des acides gras insaturés **(Vítová et al., 2015 ; S. M. Renaud et al., 1991 ; Lamers et al., 2010 ; Hu et al., 2008)**

II.5.5. Autres carences

II.5.5.1. La carence en phosphate : peut également induire une accumulation de lipides.

Le phosphate est l'un des constituants majeurs des acides nucléiques. Son absence déclenche, comme pour l'azote, un arrêt rapide de la production de macromolécules (ARN, ADN, protéines) et de la croissance, ainsi qu'un déséquilibre des flux de carbone et d'énergie entrainant une accumulation de molécules de réserve, non phosphatées. Se met alors en place une importante restructuration des membranes plasmiques. Les phospholipides, leurs constituants principaux, disparaissent au profit de glycolipides non phosphatées et de bétaines **(Guschina & Harwood, 2006).**

II.5.5.2. La carence en soufre : plus rarement étudiée a des effets analogues à ceux d'une carence en phosphate. La division cellulaire est très rapidement stoppée, principalement à cause de l'arrêt de la réplication de l'ADN. La carence en soufre semble avoir un effet très fort sur l'accumulation d'amidon. L'effet semble moins marqué sur les lipides, mais peu d'études existent sur le sujet **(Vítová et al., 2015).**

II.6.Les biocarburants

II.6.1. Définition

Les biocarburants sont des produits énergétiques d'origine végétale ou animale utilisés comme source d'énergie pour les moteurs des véhicules automobiles. L'expression « Biocarburant » (du grec bios, vie, vivant et du latin carbo, charbon, carbone). Le préfixe bio précise simplement que le carburant est d'origine biologique, produit au départ de matière vivante, animale ou végétale. Lorsque ces produits énergétiques sont utilisés pour le chauffage,ils sont considérés comme combustibles**(Hamd berna,2009)** .

II.6.2. Les sources de biocarburants

On distingue généralement trois générations de biocarburants, qui se différencient par nature de la biomasse utilisée pour leur production :

II.6.2.1. 1ère génération

Les biocarburants de la 1ère génération se partagent principalement en deux filières, selon les deux grands types de moteurs à explosion **(Hamd berna, 2009)**

A. la filière huile

Cette filière est principalement basée sur le colza, mais ,le tournesol, l'huile de coco ou l'huile de palme peuvent également être des matières premières pour cette filière. Hors agriculture, la filière huile a également un grand potentiel par le recyclage des huiles végétales

L'huile extraite des cultures oléagineuses peut, après filtration, être utilisée directement dans les moteurs diesel (mélangée au diesel ou pure). Certaines adaptations des véhicules sont nécessaires en cas de mélange au de-là de 30% d'huile. L'huile peut aussi être transformée en biodiesel par transestérification. Celui-ci est utilisé dans les moteurs diesel en mélange ou pur, généralement sans adaptations des moteurs **(Hamd berna, 2009).**

B. la filière sucre

Utilise principalement la betterave sucrière et le froment comme matières premières, et pourrait également utiliser la pomme de terre. Dans d'autres régions, on produit l'éthanol à partir de soja (USA) ou de canne à sucre (Brésil). Dans cette filière, c'est l'utilisation de la matière cellulosique : vieux papiers, bois et déchets de bois ,recyclage des palettes, cultures énergétiques (taillis à courtes rotations) qui présente le plus gros potentiel de production à coût réduit **(Hamd berna, 2009)**

II.6.2.2. 2ème génération

Les biocarburants de deuxième génération sont obtenus à partir de biomasse sans concurrence avec l'utilisation alimentaire : paille de céréales, miscanthus, bois et résidus forestiers et cultures dédiées **(Hamd berna, 2009)** .

II.6.2.2. 3ème génération

Il s'agit des les algocarburants où les microalgues peuvent fournir différents types d'énergies renouvelables. Il s'agit notamment du méthane produit par la digestion anaérobie des algues, du biodiesel dérivé de l'huile des micro-algues **(Sandesh Kamath B; 2007).**

II.6.3. Les avantages et les inconvénients de biocarburants

II. 6. 3. 1. Les avantages

- ✓ **Renouvelables** : il faut des milliers d'années pour produire des combustibles fossiles tandis que la matière première des biocarburants est renouvelable beaucoup plus

rapidement.

- ✓ **Sécurité** : en réduisant la dépendance sur les sources d'énergies étrangères, les pays peuvent protéger l'intégrité de leurs ressources énergétiques et se libérer des influences extérieures.
- ✓ **Biodégradabilité** : Les biocarburants sont facilement biodégradables et beaucoup moins dangereux à manipuler que les carburants traditionnels.
- ✓ **Faible émission de carbone** : lorsque les biocarburants sont brûlés, ils produisen significativement moins de carbone et beaucoup moins de toxine. C'est une alternative plus sûre pour préserver la qualité atmosphérique .

II.6.3.2. Les inconvénients

- **Production d'énergie** : Les biocarburants ont un rendement énergétique plus faible que les carburants traditionnels et nécessitent donc une plus grande quantité pour produire le même niveau d'énergie.
- **Coût élevé** : Raffiner les biocarburants pour produire de l'énergie plus efficace et construire des usines de fabrication nécessaires pour augmenter les quantités de biocarburants nécessitera un investissement initial important.
- **Les prix de l'alimentation** : Certaines cultures vivrières pourraient être utilisées pour l'alimentation et pour les biocarburants (exemple du maïs). La demande augmentant,les prix risquent de s'accroître également.
- **Disponibilité** : Les biocarburants ne sont pas encore disponibles facilement pour les consommateurs et la plupart des véhicules ne sont pas équipés pour fonctionner avec des biocarburants.
- **Odeur** : Selon le type de biocarburant, on est parfois confronté lors de la production à des odeurs indésirables

II.7.Le biodiesel

II. 7.1.Intérêt de biodiesel

Les sources de l'énergie renouvelable respectueuse de l'environnement ont pris une place considérable au cours de ces dernières années, remplaçant les ressources énergétiques fossiles associés à des facteurs négatifs ; ce qui en flamme la recherche à repenser à une autre source respectueuse de l'environnement et durable **(Ibrahim Birma et *al* ,2015)** .

A l'heure actuelle, la demande pour les carburants liquides de transport, continue à augmenter vue les préoccupations du changement climatique, ainsi que la pollution de l'air et la destruction des écosystèmes, qui sont liés directement à la production et la combustion de pétrole **(Levine RB et *al*,2011)** . En plus de ces problèmes, les sources d'énergies classiques

ne sont pas durables et leurs dérivés portent à long terme, à des conséquences sanitaires et environnementales comme l'effet de serre, des pluies acides, ainsi que les pollutions atmosphérique et de l'eau **(Dincer I et *al*,2000).** De même, l'utilisation des produits connexes dérivées des produits pétroliés, tel que les produits chimiques et le plastique, qui ne sont pas biodégradables émettent des fumées toxiques.

Toutefois, le taux d'épuisement des combustibles fossiles, a créé un intérêt pour le bio-diesel **(Aguilera RF et *al*,2009)** , qui a attiré l'attention intensive comme un biocarburant important **(Yangmin Gong et *al*,2011)** ; le biodiesel, un alternatif possible qui pourraient remplacer les carburants fossiles et peut devenir la première source d'énergie dans le monde **(Feofilova et *al*,2010).**

II.7.2. Définition de biodiesel

Le biodiesel est un ester méthylique obtenu par réaction chimique avec un alcool et des matières grasses issues des végétaux ou des microalgues**(HAMD BERNA,2009).**

Le biodiesel est un carburant renouvelable propre, a récemment été considéré en tant que meilleur candidat pour une substitution de gazole parce qu'il peut être employé dans n'importe quel moteur à allumage par compression sans le besoin de modification

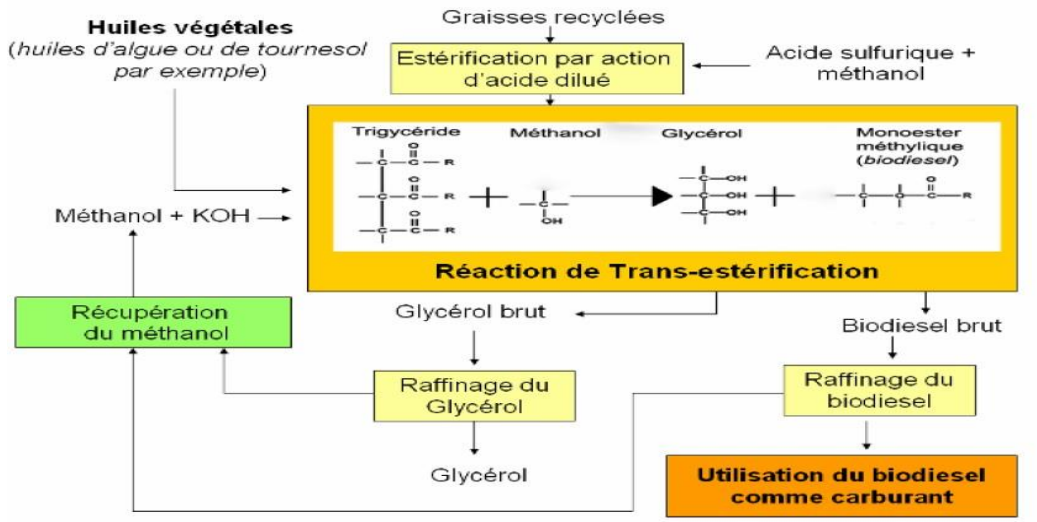


Figure II.4: Techniques d'obtention du biodiesel

II.7.3. La production de biodiesel

Le potentiel des micro-algues à visée biodiesel est maintenant bien établi. Cette voie suscite l'intérêt et l'espoir des chercheurs. La Figure II-7 décrit le concept de production d'huile de micro-algues en vue d'obtenir du biodiesel. Ce procédé comporte une étape de production de

biomasse micro-algale,de récolte,concentration,d'extraction des lipides puis transformation en biodiesel.

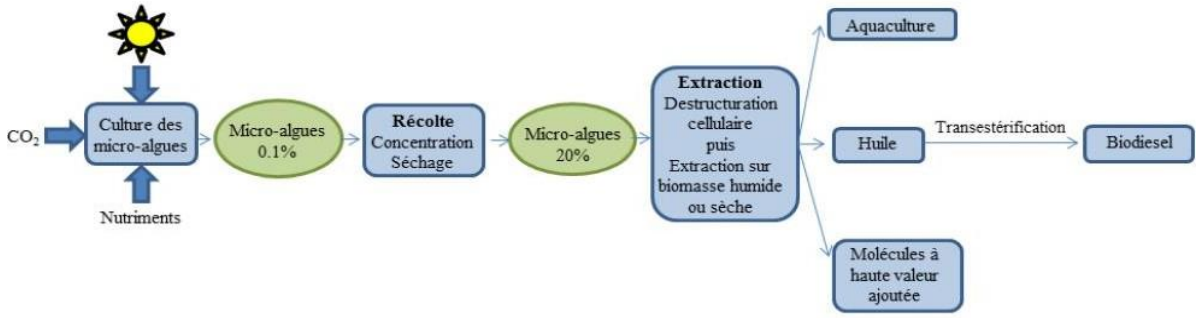


Figure II.5 : Concept de production d'huile de micro-algues visant à obtenir du biodiesel

II.7.3.1. Les différentes étapes de production de biodiesel

- **Etape de mélange des réactifs**

Les réactifs, l'huile et l'alcool (méthanol ou éthanol) sont introduits, puis mélangés dans la cuve servant de réacteur en présence du catalyseur. Selon la configuration du réacteur, les réactifs sont introduits soit directement dans la même cuve ou soit de manière séparés dans de différentes cuves par la suite, mélangés dans la cuve d'huile.

- **Etape de réaction**

Une fois que le mélange huile/alcool ait lieu dans le réacteur, le processus de la réaction de transesterification se déclenche pour durer un certain temps. Les conditions de température et de pression sont fonction du type de catalyse. Un système de chauffage du réacteur et de l'agitation est nécessaire pour la réaction. A la fin de la réaction, huile passe à l'état d'ester en changeant ses propriétés physico-chimiques : la viscosité, la densité, la masse molaire.

- **Etape de décantation**

Après la formation des esters au cours de la transesterification, une étape de décantation du produit est nécessaire pour séparer le biodiesel du glycérol. Le glycérol plus dense que le biodiesel se condense dans la partie basse. La décantation peut s'effectuer dans le réacteur par gravité, ou dans des décanteurs statiques ou par des centrifugeuses pendant deux à trois heures de temps.

- **Etape de lavage**

Une étape de purification de l'ester consiste à éliminer les impuretés telles que la glycérine résiduelle, l'excès d'alcool, les traces de catalyseurs, savons et sels formés par la catalyse

homogène.Cette opération s'effectue par lavage du biodiesel à l'eau. Une purification poussée des esters est réalisable par passage sur une colonne remplie d'un absorbant sélectif ou un lit de résines échangeuses d'ions.

- **Etape de séchage**

Après lavage du biodiesel à l'eau, l'opération de séchage permet d'évacuer l'eau présente. Elle est le plus souvent réalisée par chauffage à une forte température du biodiesel lavé, la température de séchage pouvant atteindre 140°C en procédé continu par catalyse homogène

Deuxième partie : Expérimentation, résultats et discussion

CHAPITRE I: Matériel et méthodes

I.1 Matériel

I.1.1Matériel biologique

La souche utilisée dans notre travail est une microalgue bleue verte *Arthrospira platensis* d'origine de Tamanrasset . Elle a été fournie en culture par le laboratoire de microbiologie d (faculté des sciences de biologie) .Université de Yahia Farés

I.1.2Matériels non biologiques

Les différents appareillages, matériel et produits chimiques de laboratoire utilisés sont présentés dans la partie 'Annexe N°1'

L'étude expérimentale est réalisée au niveau de :

- Laboratoire de microbiologie (faculté des sciences de l'université de Médéa)
- Laboratoire de chimie 2 (hall technologique)

I.2.Méthodes de travail

I.2.1 .Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental a été structuré de manière à ce que la souche soit cultivée dans un milieu de culture favorable par la présence des éléments minéraux nécessaires à la croissance dans des photo-bioréacteurs cylindriques dont un diamètre de 8 cm et une hauteur de 12 cm , maintenus dans des conditions de :

- Eclairement : Un éclairage permanent est assuré à l'aide d'une lumière blanche par lampe fluorescente (2500 lux)
- Température : La température est maintenue à une valeur optimale de 32°C à l'aide de thermostats réglables
- Débit d'air : L'agitation des cultures est assurée par barbotage d'air à l'aide de pompes à air avec un débit de 3l/min.

Les échantillons ont été prélevés chaque jour pour mesurer la densité optique (DO), détermination de la productivité et le taux de croissance spécifique



Figure I.1: Culture de la spiruline dans les conditions expérimentales

I.2.2 Préparation de milieu de culture

- **Description de milieu**

Le milieu de culture de référence étant le milieu standard Zarrouk (décrit par Zarrouk en 1966.)

Il est composé d'eau et éléments nutritifs essentiels pour la croissance d'*Arthrospira platensis*

Le milieu de culture de la spiruline doit être apporté tous les éléments suivants: **(Zarrouk,1966).**

- ✓ *bicarbonate de sodium ($NaHCO_3$):* est la source d'alcalinité, qui peut aussi apporté par le natron ou l'eau de cendre.
- ✓ *le phosphore (P)* : est indispensable pour la photosynthèse, apporté par n'importe quel Ortho phosphate soluble. **(Camacho Rubio Fet *al*., 1999**)
- ✓ *l'azote* : est un constituant important des acides aminés, qui apporté principalement par l'azote minérale $NaNO_3$ minérale.
- ✓ *le carbone(C)* : c'est la nourriture principale de la spiruline, qui apport principalement par le gaze carbonique.
- ✓ *les métaux* : essentiellement le fer, le bore et le magnésium **(Prat R. et Vonarx V., 2008).**

- **Préparation de milieu**

Les composants de milieu sont pesés et mélangés avec l'eau distillée puis le mélange est agité pendant 20min et par la suite le milieu de culture est ajusté à pH = 9 par addition de NaOH (4N). Il est conservé à l'abri de la lumière, après stérilisation à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes. Sa composition est donnée dans le tableau (annexe 8).

I.2.3 Préparation de l'inoculum

-Filtration

La filtration est un moyen de séparer les contaminants de la spiruline et les minimiser ou les éliminer **(Jourdan., 1999).**

Les flacons de 500 ml contenants la spiruline sont filtrés à l'aide de papier filtre Whatman N°4 de porosité de 13µm qui est inférieure à celle de spiruline et supérieure à celle des contaminants bactériens **(Fox., 1999)**

Les filaments de spiruline dans le papier filtre ont été récupérés dans des flacons de 500 ml contenant le milieu Zarrouk.

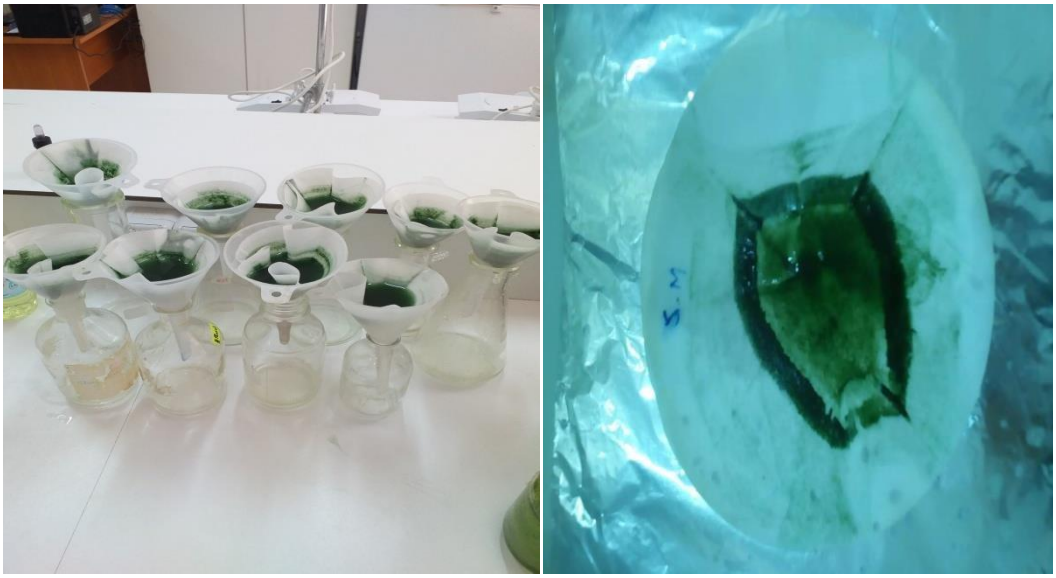


Figure I.2: Technique de filtration de spiruline.

-Contrôle de l'état physiologique de la culture

La viabilité ,la physiologie de culture algale et le niveau de contamination sont vérifiées par la couleur ,odeur ,aspect .

I.2.4.Examen microscopique

I.2.4.1. Examen à l'état frais

a) But

- ❖ Vérifier l'état de culture
- ❖ Avoir une idée sur l'étape de croissance

- ❖ Mettre en évidence la mobilité
- ❖ Faire une approche sur la morphologie.

On dépose sur une lame porte-objet une goutte de culture de la souche *Arthrospira platensis* à examiner, cette goutte est recouverte d'une lame couvre-objet.

La préparation est examinée à l'objectif à immersion (100x), après dépôt d'une goutte d'huile à immersion.

Observations

- Grossissement 40x, 10x
- Diaphragme quasiment fermé pour augmenter le contraste.
- Une intensité lumineuse ajustée.

I.2.4.2Coloration de Gram

La coloration de Gram (mise au point par Christian Gram) est une "coloration double", qui permet de différencier les bactéries : D'après leur forme et leur affinité pour les colorants.

Technique

-Une goutte d'eau stérile est déposée sur une lame, puis a l'aide de l'anse de platine une parcelle de la culture d'*Arthrospira platensis* est prélevée et mélangée avec la goutte d'eau .

- le frottis est séché et fixé au-dessus de la flamme du bec Bunsen sans trop le chauffer.

1- Coloration : Par le violet de gentiane phéniqué durant une minute. Toutes les bactéries prennent ce colorant et sont donc colorées en violet.

- Rinçage à l'eau du robinet

2- Mordançage : La lame est recouverte par le réactif de Lugol 1 minute (réactif iodo-ioduré qui accentue la coloration).

- Rinçage à l'eau

3- Epreuve (alcoolo résistance) : Ajout d'alcool puis rinçage à l'eau .

Pendant cette étape, les lipides de la paroi des Gram- sont dissous et l'alcool peut donc pénétrer dans le corps bactérien et expulser le violet de gentiane. Les bactéries Gram - sont alcoolo-sensibles et sont donc décolorées. La paroi des Gram + ne laisse pas passer l'alcool et sont dites alcoolo résistantes et restent colorées en violet.

4- Contre coloration : Fuschine diluée au 1/20ème ou de safranine pendant une minute. Toutes les bactéries prennent le colorant mais le violet masque la fuschine. Les « Gram positives » apparaissent donc violettes, les « Gram négatives », recolorées par la fuschine, apparaissent roses.

- La lame est rincée à l'eau du robinet et séchée délicatement entre deux feuilles de papier absorbant.

Observation microscopique

L'observation microscopique est effectuée avec l'objectif (100x), après dépôt d'une goutte d'huile à immersion.

I. 2.5.Contrôle de l'évolution de biomasse

La biomasse d*'Arthrospira platensis* est évaluée en mesurant la densité optique de la culture chaque jour à λ = 680 nm par un spectrophotomètre**. (Mark A. Tedesco.Mark et *al* . ,1989)**. Les DO obtenues ont été converties en concentrations de cellule sèche (Poids sec) en utilisant l'équation de la courbe d'étalonnage .

I.2.5.1. Détermination du poids sec

Le poids sec de biomasse d'*A.platensis* est déterminé par la méthode d'Avigad Vonshak (1997)**,** les étapes de séchage et la détermination de poids sec (Ps) sont résumées comme suivant :

- Des dilutions ont été préparées dans la gamme 25-100%, puis à partir de chaque dilution la densité optique correspondante est mesurée.
- Les échantillons sont filtrés à travers un filtre Whatman N:4 de porosité 13µm préalablement séchés dans l'étuve pendant 24 h pendant une nuit à 70°C (ou bien 2 h à105°C) .
- Chaque filtre (vide) est pesé (Pv) et numéroté de 1 à 4
- Les filtres sont placés dans des boîtes de pétri à l'étuve pendant une nuit à 70°C (ou bien 2 h à105°C).
- Après avoir refroidir les filtres dans un dessiccateur (20 min), ils sont à nouveau pesés (Pc)
- Le poids sec est calculé selon l'équation suivante:

$$Ps=(Pc-Pv)/V \quad \text{.....(I.1)}$$

Où :

- ✓ Ps : poids sec.(gramme)
- ✓ Pc : poids chargé. (gramme)
- ✓ Pv : poids vide (gramme)
- ✓ V : volume filtré (litre)

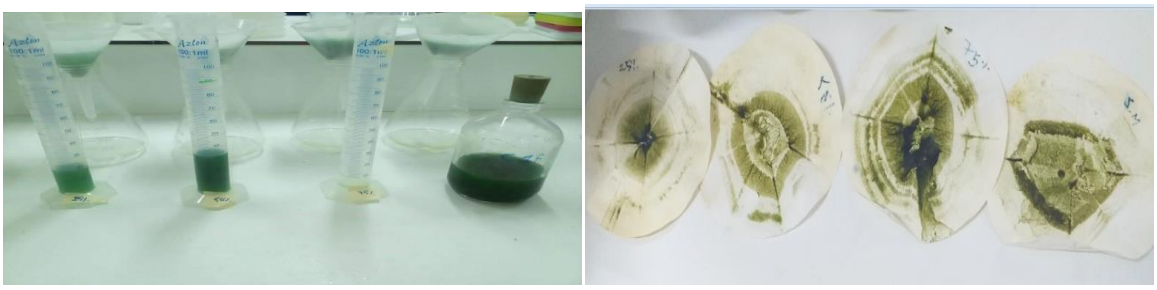


Figure I.3 : dilutions de suspension algale et séchage des filtres

I.2.5.2.Calcule de la productivité volumique

La productivité volumique (Pv) est définit par la quantité de biomasse produite par volume de culture et par unité de temps **(J.Falquet et *al.*, .2006).**

$$\mathbf{Pv = (X_f – X_0)/ (t2 - t1) \ldots\ldots\ldots (I.2)}$$

Tel que :

- ✓ Xf : la concentration finale (g/l)
- ✓ X0 : la concentration initiale (g/l)
- ✓ t1 et t2 : les temps de croissance (jour)

I.2.5.3.La vitesse de croissance

La vitesse de croissance ou taux de croissance µmax, le temps de génération G ainsi que la productivité P sont calculés à partir des formules suivantes :
Taux de croissance ou vitesse de croissance correspond au nombre de division cellulaire pour temps de croissance. Calculer selon l'équation **(Falquet.J,et *al.*, .2006) :**

$$\mathbf{\mu max = (\log Xf – \log X_0) / (t2 - t1) \log 2 \ldots\ldots (I.3)}$$
$$\mathbf{et\ G = 1/ \mu max \ldots\ldots\ldots\ldots (I.4)}$$

Tel que :

- ✓ X_0 : La concentration initiale (g/l)
- ✓ Xf : La concentration finale (g/l)
- ✓ µmax :La vitesse de croissance (J^{-1})
- ✓ **G :**Le taux de géneration (J)

I.2.6.Détermination de la chlorophylle a

Un échantillon de 5 ml de suspension algale additionné avec 5ml de méthanol est centrifugé pendant 5 min à 3500 tpm.

Le culot est conservé (le surnageant est rejeté), le culot est remis en suspension dans 5 ml de méthanol et homogénisé.**(Vonshak ,1997)**

Les échantillons sont incubés dans un bain-marie, à 70 ° C pendant 2 min. Ensuite, l'échantillon est centrifugé à nouveau pendant 5min à 3500 tpm, et le surnageant est utilisé pour la mesure.

La densité optique de ce dernier est lue au spectrophotomètre (UV - Visible) à 665, 645 et 630 nm. La quantité de chlorophylle est calculée selon l'équation suivante **(Vonshak ,1997):**

$$[\text{Cha}] = 11.6(DO665) - 1.31(DO645) - 0.145(DO630) \quad \text{..... (I.5)}$$

Cha c'est la concentration de chlorophylle a en mg/l

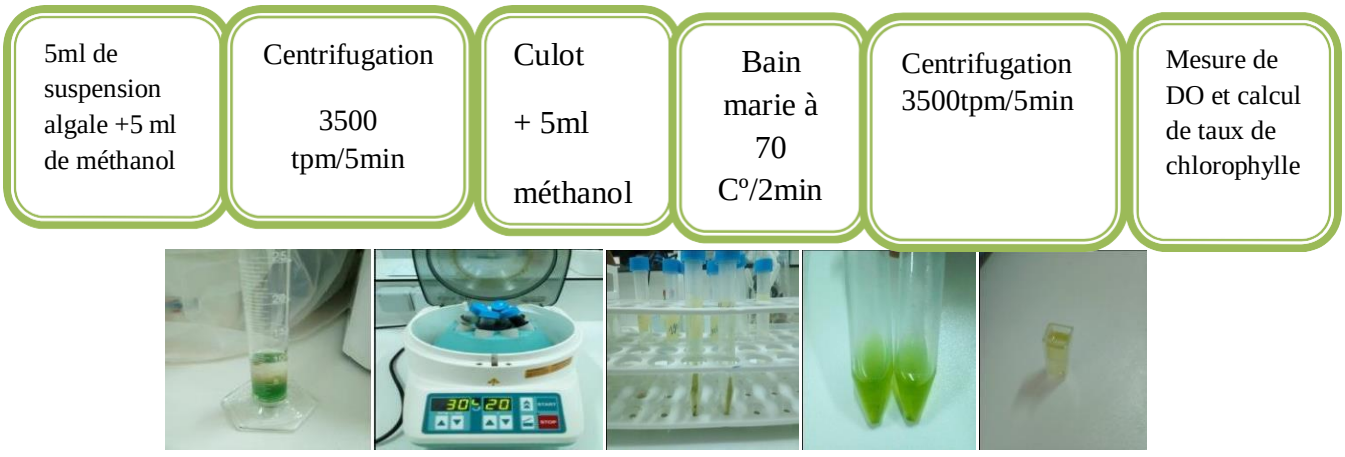


Figure I.4 : Etapes de détermination de la chlorophylle a

I.2.7.Détermination du taux de cendres

La teneur en cendres (minéraux) a été estimée par incinération au four à moufle à 550 °C de façon à obtenir la totalité des cations sous forme de carbonate et autres sels minéraux anhydres **(Aocs,1990).**

Mode opératoire

3 grammes de biomasse sèche de culture initiale ont été introduits dans un creuset en porcelaine préalablement taré. L'ensemble est placé dans un four à moufle à 550 °C pendant 3 heures.

Après refroidissement au dessiccateur pendant 30 minutes, on pèse à nouveau (**Pf**).

La teneur en cendres est donnée par la formule suivante :

Taux de cendres (%) =$\frac{Pf-Po}{Pe} * 100$ .....(I.6) .(DANSOU., 2002)

PE : Prise d'essai.(gramme)
PO : Poids du creuset à vide. (gramme)
PF : Poids total en fin d'incinération.(gramme)

I.2.8.Effet de l'azote sur l'accumulation des lipides

Des conditions de carence en azote sont connues pour stimuler la synthèse des lipides .Ces conditions ne doivent toutefois pas être maintenues trop longtemps puisqu'elles peuvent éventuellement entraîner une consommation des lipides synthétisés **(Cadoret et Bernard, 2008).**

Cette expérience consiste à soumettre la souche *Arthrospira platensis* à un stress (carence en Azote) ,Il s'agit de cultiver la spiruline dans deux milieux de culture (Zarrouk modifié) qui se différent par leurs teneurs en Azote pendant une semaine .

Méthode de mise en culture

Lorsque la densité optique de la culture initiale est mesurée et atteint la valeur de 2 ; c'est-à-dire (X0=2g/l), un volume de 500 ml de la suspension algale est filtré par un papier filtre
Les filaments obtenus à partir de filtration de 250ml sont mélangés avec 1 litre de milieu Zarouk modifié ($M_{0.1}$:NaNO3 =0.1 g) et l'autre moitié de suspension filtrée est mélangée avec 1 litre de milieu Zarrouk modifié ($M_{0.03}$: NaNO3=0.03g) puis chaque culture de la spiruline est mise dans un bac qui contient un thermostat réglée à T=30ºC et une pompe air aquarium pour l'agitation sous une intensité lumineuse de 2500 Lux .



Figure I.5:Culture de spiruline sous conditions de carence en Azote

I.2.9.Effet de la mélasse sur l'accumulation des lipides

-Dans chacun des 4 erlenmeyers un volume de 1litre de milieu Zarrouk a été versé et additionné par une quantité croissante de mélasse (0.25g ; 0.5g ; 0.75g ; 1g)

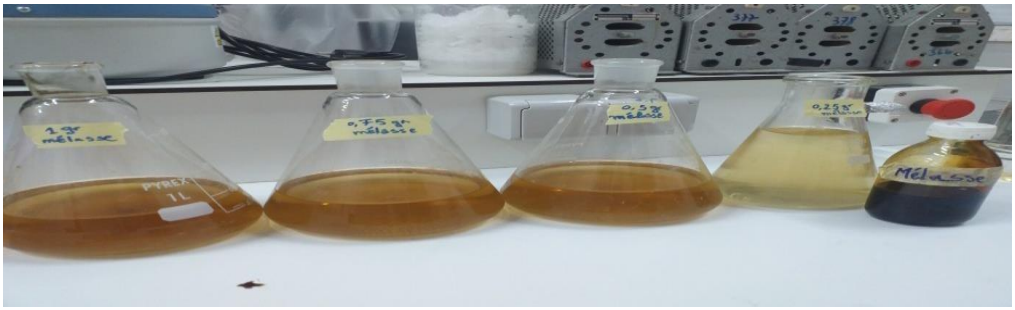


Figure I.6 : Différents milieux Zarrouk modifiés produits par l'addition de mélasse

- Lorsque la densité optique de la culture initiale(contrôle) est mesurée et atteint la valeur de 2 , c'est à dire X0=2g ,un volume de 250ml de la suspension algale est filtré par un papier filtre. Le contenu résulté de la filtration est ensemencé dans chaque milieu Zarrouk modifié par l'addition de la mélasse.

- Chaque culture de la spiruline est mise dans un bac ou flacon de 1 litre qui contient un thermostat réglée à T=30ºC et une pompe air aquarium pour l'agitation sous une intensité lumineuse de 2500 lux pendant 3 jours .



Figure I.7 : Culture de la spiruline avec différentes concentrations de mélasse

I.2.10.Effet de la lumière

Une augmentation soudaine de l'intensité lumineuse produit un effet favorable pour la production des lipides **(Takaji et *al*,2006).**

Deux flacons de 500 ml de culture initiale (standard) ayant DO=2 sont filrés , ensuite ensemencés dans 4 flacons ou bacs de 1 litre de milieu Zarrouk standard additionné avec 1g de mélasse (la meilleure concentration) .Ces flacons sont exposées à différentes intensités

lumineuses (1000lux ,2500lux,3000 lux, 4000 lux) avec une température constante de 30°C et incubés pendant 3 jours .

I.2.11.Effet de la Température

Un flacon de 500 ml de culture initiale à une DO=2 a été filtré puis ensemensé dans deux bacs de 1L contenant (milieu Zarrouk +1g de mélasse) ,le premier est incubé sous une T°=35°C et le deuxième à T°=30 °C ,sous une intensité lumineuse =2500 Lux qui est la meilleure intensité lumineuse .

I.2.12.L'extraction des lipides

L'extraction est une étape nécessaire qui est présente dans de nombreux procédés de fabrication et dans différents domaines industriels relevant de la pharmacie, de la cosmétique, de la parfumerie et de l'agroalimentaire. **(Chemat, 2011)** Nombreuses méthodes d'extraction sont spécifiquement utilisées dans le cas des lipides des microalgues ; l'extraction par Soxhlet reste le procédé le plus largement employé à cause de :

- ✓ Recyclage de solvant
- ✓ Aucune nécessité de filtration après l'extraction. (**Allaf K ,2008)**

I. 2.12.1. Préparation d'échantillon

La préparation de la matière première de notre étude consiste à récupérer la biomasse d'algue cultivée dans les différents milieux de culture par la filtration à l'aide de papier filtre puis la biomasse passe par une étape de séchage d'algue à l'abri de la lumière à température 100 Cº pendant 12h **(Safak Seyhaneyildiz Can et *al* ,2017)** suivi de broyage et pesage à l'aide d'une balance.



Figure I.8:Les étapes de préparation de biomasse à extraire

Les conditions de culture pour l'extraction sont mentionnées dans le tableau ci dessous :

Tableau I.1 : Conditions de culture pour l'extraction des lipides :

Expérience	Concentration de l'élément (g/l)
Culture de contrôle (Zarrouk standard)	$NaNO_3$= 2.5
Carence en azote $NaNO_3$	0.1
	0.03
Addition de mélasse	0.25
	0.5
	0.75
	1

I.2.12.2. L'extraction par soxhlet

Il s'agit d'une extraction solide-liquide, L'extracteur de Soxhlet permet le traitement de

solides de toutes tailles avec des solvants en phase liquide ou partiellement vaporisés

L'appareil de Soxhlet permet de réaliser une extraction par solvant d'un composé chimique (lipides) contenu dans une poudre solide (spiruline sèche). **(Tdjini, 2006).**

L'extraction par soxhlet est une méthode simple et convenable permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction (4cycles) avec du solvant frais jusqu'à l'épuisement complet du soluté dans la matière première. **(Penchev, 2010).**

Dans le montage chaque échantillon broyé est mis dans une cartouche en papier-filtre épais en nitrocellulose qui est ensuite placée dans un siphon fixé sur un ballon rempli de solvant d'extraction (2v méthanol/1v chloroforme) **(Djoye .C ,2013).** Le tout est surmonté d'un réfrigérant.

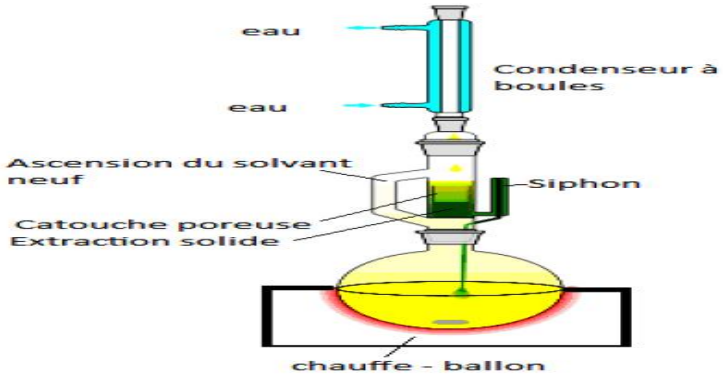


Figure I.9 :Extraction des lipides d'*Arthrospira platensis* par l'appareil de Soxhlet

- Après deux heures d'extraction on récupère l'huile extraite mélangée au solvant. La séparation se fait à l'aide d'un appareil appelé « Rotavapor » pendant 30min à 61 ºC

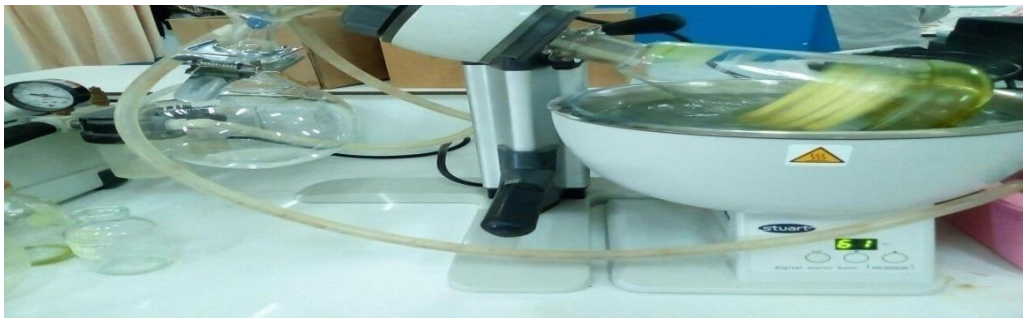


Figure I.10 : Evaporation du solvant par le rotavapeur

- Après évaporation de solvant ,le ballon contenant la matière grasse est refroidi 30 minutes au dessiccateur et pesé.

Taux de matières grasses (%) = (PF –PO /PE)*100… ..... (I.7)

(Dansou ,2002)

PE : Prise d'essai (gramme)

PO : Poids du ballon vide (gramme)

PF : Poids du ballon contenant la matière grasse (gramme)

Chapitre II: Résultats et discussion :

II.1 Caractérisation morphologique de la spiruline

II.1.1 Contrôle de la viabilité et de l'état physiologique d'*Arthrospira platensis*

Les cultures utilisées durant tout les expériences répondent aux bons caractères physiologiques telles que : une culture flottante, une fluorescence de couleur verdâtre, odeur agréable, avec un âge qui ne dépasse pas 7 jours. La contamination de la culture est détectée par une mauvaise odeur résulté de la fermentation, la présence des exopolysaccarides (EPS) et une couleur verte qui n'est pas claire.

II.1.1.2 .Etude microscopique

La forme et la couleur de la Spiruline varient en fonction du caractère physique et chimique du milieu de culture. Les figures ci-dessous nous montrent les différentes morphologies observées (figure II.1), (figure II. 2) ,(figure II.3), (figure II.4).

II.1.1.2.1 : Observation microscopique à l'état frais

Une observation périodique au microscope optique nous a permis de surveiller la morphologie de la Spiruline tout le long de la période de culture et d'expérimentation.

- En Absence de stress (culture de contrôle) : la spiruline vue au microscope :

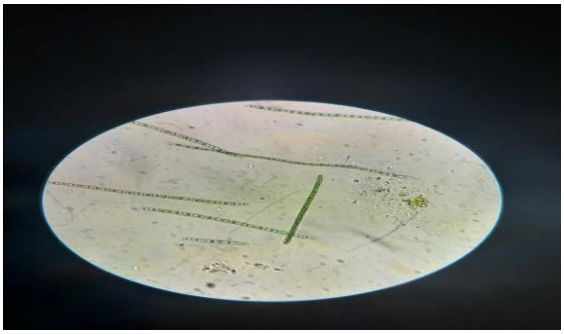


Figure II.1 : Filaments de forme droite à l'état normales ; observés au microscope optique grossissement G40x

L'observation microscopique de spiruline à l'état frais montre qu'elle est présentée sous une forme droite et filamenteuse avec une couleur verte . Ce qui confirme que notre culture de la spiruline a été en bon état de culture selon **(Muhling., 2000).**

❖ Durant le stress (carence en azote):



A B

Figure II.2 : Observation de la spiruline dans le cas de stress azoté

A : NaNO3 = 0.03 g/l et B : NaNO3 = 0.1 g/l à grossissement G40x(A) et G10x(B)

D'après la figure II.2 on observe des enchevêtrements des filaments qui baignent dans une matière mucilagineuse et présence des vésicules lipidiques accumulées.

- Sous l'effet de mélasse :

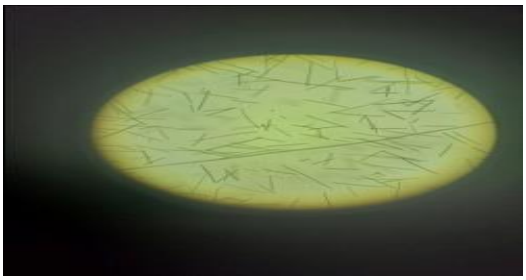


Figure II.3 : Observation microscopique de spiruline en mixotrophie G10x

La morphologie d'*Arthrospira platensis* cultivée en mixotrophie est sous forme de palissades droites de couleur verte bien claire et nette.

Cette observation permet de déduire que l'addition de mélasse à la culture ne provoque aucun changement ou déformation morphologique.

II.1.1.2.2 : Observation microscopique après coloration

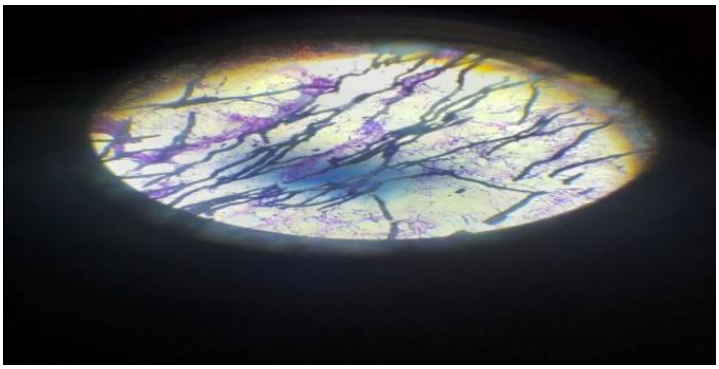


Figure II.4 : Observation microscopique de la Spiruline à l'objectif 100x après coloration de Gram

A partir de la figure II.4 on remarque que les filaments de spiruline sont colorés en rose foncé ce qui explique qu'elle appartient au groupe des bactéries Gram - .

II.2 : Cinétique de croissance

II.2.1 : Estimation du poids sec (courbe étalon)

Le poids sec en biomasse (La concentration en biomasse sèche) est obtenu par corrélation avec la densité optique mesurée à 680 nm selon l'équation suivante :

DO=0.209ps-0.017……(II.1)

Avec R2=0.998

Les résultats sont exprimés dans la figure II.5 sous forme d'une droite où la DO de la culture augmente proportionnellement et linéairement avec le poids sec de la spiruline , ce qui prouve qu'il y a une bonne corrélation entre les deux variables étudiées

Cette courbe étalon permet de calculer la concentration de spiruline, donc de suivre l'évolution de la cinétique de croissance

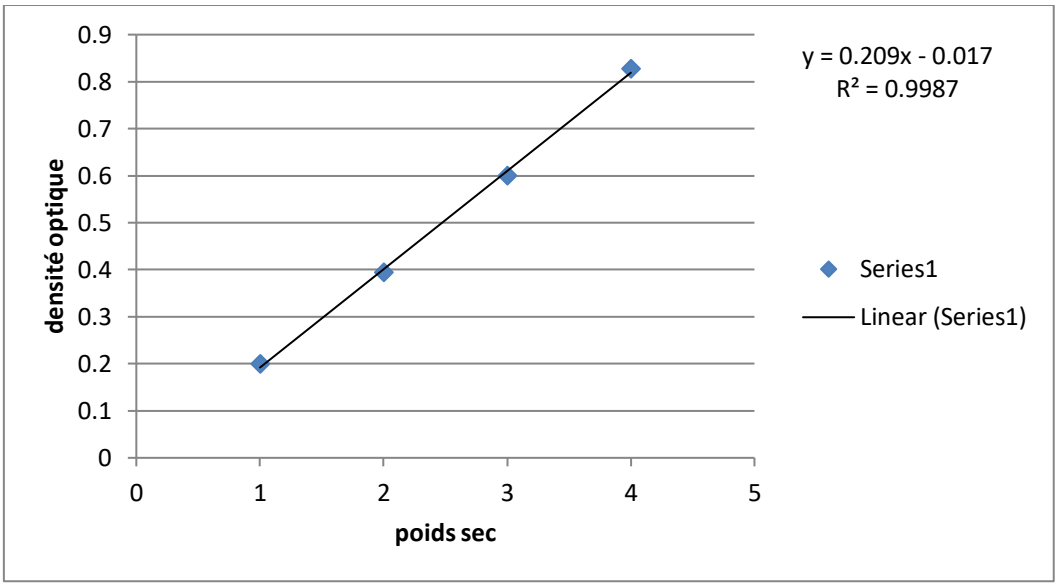


Figure II.5 : courbe étalonnage représente l'évolution de la densité optique en fonction de poids sec de spiruline .

II.2.2.Densité optique et mesure de croissance dans la culture témoin

On a mesuré l'absorbance (DO) quotidiennement pour avoir une estimation de la concentration de la biomasse.

A l'aide d'une lecture spectrophotomètrique de la densité optique de la culture de contrôle (milieu Zarrouk) à une longueur d'onde de 680 nm**.(Mark A. Tedesco.Mark et *al* . ,1989)**

Tableau II.1 : Evolution de densité optique de la culture initiale (de contrôle) de la Spiruline

Le temps (jours)	La densité optique (DO)
Jour 1 (ensemencement)	0.89
Jour 2	0.92
Jour 3	1.23
Jour 4	1.37
Jour 5	1.41
Jour 6	1.45
Jour 7	1.51
Jour 8	1.84
Jour 9	1.82
Jour 10	1.91
Jour 11	1.93
Jour 12	2.03
Jour 13	2.16
Jour 14	2.14
Jour 15	2.12

Le tableau II.1 et la figure II.6 montrent que pour la culture initiale de contrôle, la densité optique augmente en fonction du temps jusqu'à J7 de culture avec une valeur initiale de DO 0,63(phase exponentielle), ce qui explique un début de croissance de la spiruline .Au-delà du 8ème jour les valeurs de DO augmentent jusqu'à atteindre la valeur maximale DO= 2.13 qui correspond à J 13 . A la fin de la culture une légère diminution de valeurs a été observée correspondant a un début ralentissement de la croissance(phase stationnaire)

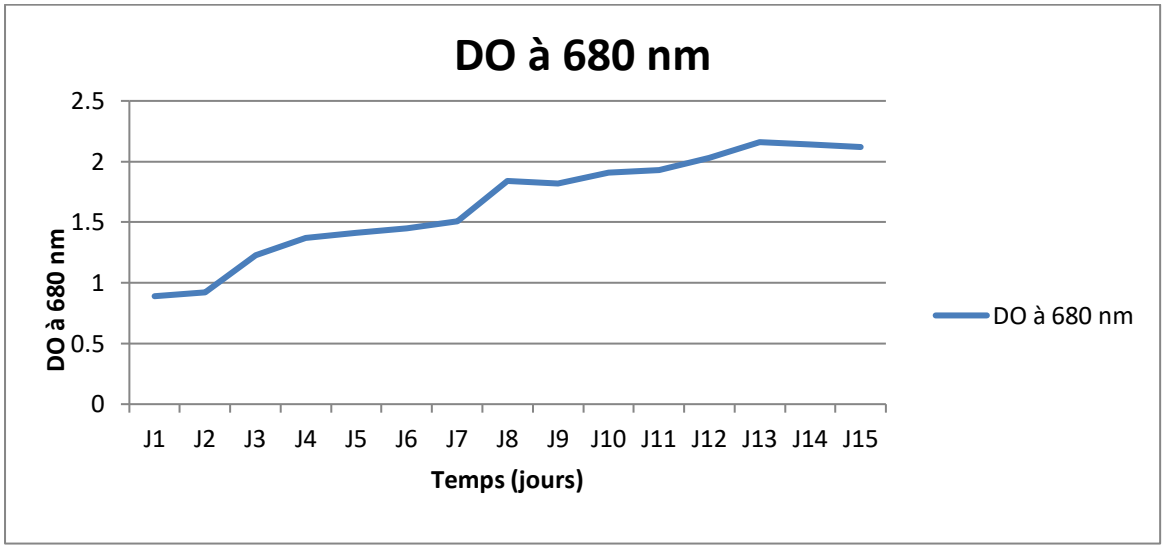


Figure II.6 : Courbe des valeurs d'absorbance (DO) en fonction de temps de la culture témoin de la spiruline .

II.2-3 Evolution de la Concentration en biomasse dans le milieu Zarrouk modifié (cas de stress azoté)

On a suivit la croissance de la spiruline pour une semaine où une même quantité de la souche(2g) a été ensemencée dans trois milieux de culture en : milieu zarrouk (Mz 2.5 g/l de NaNO3) ; et deux autres milieux Zarrouk epuisés en azote (M 0.03g/l de NaNO3 ; et ;M0.1g/l de NaNO3). Les cinétiques de croissance sont exprimées par le poids sec en fonction du temps

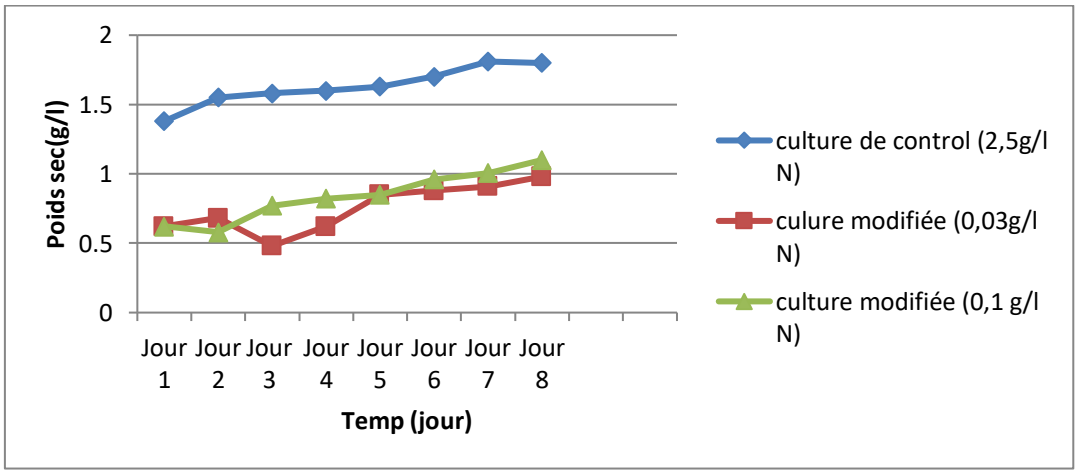


Figure II.7 : Evolution de la croissance (poids sec) de la spiruline en fonction de temps

La figure II.7 présente la croissance de la spiruline des trois cultures réalisées pour mesurer la biomasse. On remarque que l'allure des trois courbes est similaire se forme sigmoïde c'est a dire l'évolution des trois cultures sont quasi-identiques. On retrouve les différentes phases de croissance(latence, exponentielle et stationnaire)

On distingue clairement une courte phase de latence (J1-J2) : correspondante au temps d'adaptation avec les conditions de la culture. Ces dernières étant les mêmes que celles utilisées pour l'inoculum, et qui ont permis de réduire le temps d'adaptation. Selon Borgne , 1986 , la durée de cette phase dépend de l'âge de l'inoculum et son adéquation enzymatique aux nouveaux substrats du milieu en question.

A partir du 7ème jour survient une stabilité du poids sec de la biomasse ce qui correspond à la phase stationnaire d'une durée de 2 jours ($\mu = 0$) pendant laquelle la population de spiruline atteint sa valeur maximale qui correspond à DO =1.81.

Elle représente un équilibre entre le gain des cellules viables et celles qui commencent à se faiblir à cause des conditions difficiles du milieu.

$$G=(t-t0)\log 2/(\log X-\log X0)\ldots\ldots\ldots(II.2)$$

En effet, la tendance des courbes en cas de carence en azote (0.03g/l et 0.1 g/l) est similaire mais la tendance des valeurs de milieu de control est supérieure a celle de milieu de stress azoté cela est due au carence en $NaNO_3$ qui régresse et diminue le taux de croissance avec le ralentissement de vitesse de croissance **(Olgun et *al*,2000).**

La cinétique de croissance semble plus rapide dans la culture de contrôle (G contrôle=1.62j) ; ceci peut être liée à disponibilité de tous les éléments dans le milieu **(Vonshak 2002)** . Le ralentissement de la croissance dans les autres milieux de stress azoté (G à 0.1$NaNO_3$= 3.38j;3jet G à 0.03=2.6j) est expliquée par la diminution ou l'épuisement de la concentration de la source d'azote ($NaNO_3$) dans le milieu de culture et l'orientation de métabolisme algale vers la production des lipides .

II.3. Etude physico-chimique

II. 3.1. Détermination du taux de cendres

Après incinération de la spiruline dans le four à moufle ,le cendre obtenu se forme des traces des sels minéraux (figure II.8). Le taux de cendres de cette poudre exprimée au pourcentage de poids sec est environ 8.93% ,ce pourcentage conforme aux normes (7 %-10%) selon **(Calment . 2002)**et lié à la capacité d'absorption des minéraux du milieu de culture par la spiruline **(Rangsayatorn et *al*.,2004.)**



Figure II.8 : Poudre de la spiruline après incinération

II.3.2 : Détermination de taux de lipides

- Après extraction des lipides par l'appareil de Soxhlet on a obtenu des lipides non pures (mélangés avec des traces de solvant) présentés dans la figure II..9 :

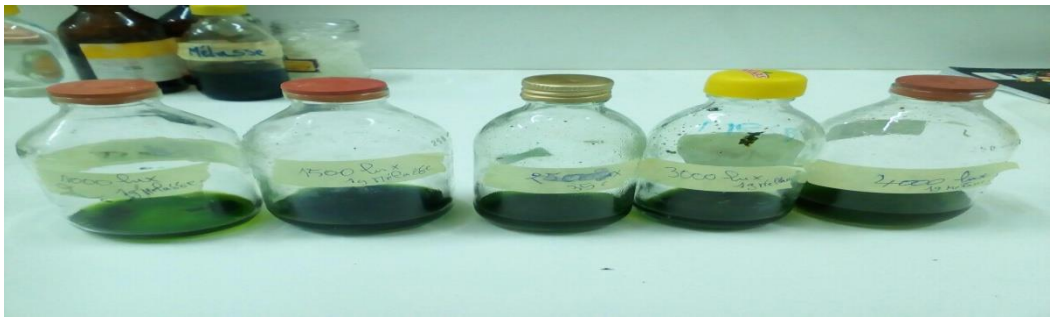


Figure II.9 : Lipides extraits par le Soxhlet

- Les lipides résultés après évaporation sont présentés la figure II.10 :



Figure II.10 : lipides après évaporation au rotavapeur

II.3.3 : Effet de stress (carence en azote) sur la productivité, l'accumulation des lipides, la teneur en chlorophylle a

Les résultats obtenus sur la productivité en biomasse, accumulation des lipides et taux de chlorophylle a sont montrés dans l'histogramme (figure II.11)

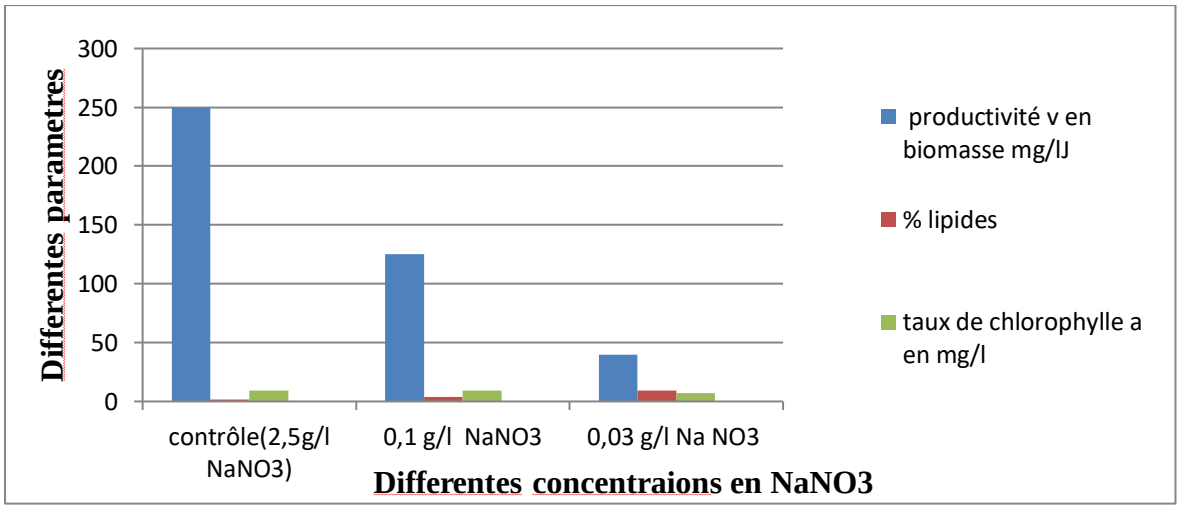


Figure II.11 :Effet d carence en azote sur la teneur en lipides ,chrolophylle et productivite volumique en biomasse de la spiruline

A partir de cet histogramme (figure II.11) , les valeurs de la productivité en biomasse sont 250g/l/j ;125g/l/j ;40g/l/j respectivement pour (Mz 2.5g/l,M 0.1g/l et M0.03g/l), on observe que la productivité diminue avec l'épuisement de milieu en azote et la meilleure productivité obtenue est celle de milieu de référence Zarrouk;ces résultats sont en accord avec les résultats trouvés par **(Kate E.Bannille,2012).**

Cela peut être due au fait que l'azote est un élément très important pour la production des protéines, c'est un composé majeur des acides aminées, il joue un rôle essentiel dans nombreuses fonctions critiques comme la photosynthèse et la multiplication cellulaire .

La concencentration de la chlorophylle a chez la spiruline à été estimée par un dosage specctrophotométrique , les résultats montrent que le taux de chlorophylle a diminue avec la diminution de concentration d'azote dans le milieu de culture (9.37 mg/l pour le milieu de control Mz; 9.05 mg/l pour le M0.1g/l) et(7.01 mg/l pour le M0.03 g/l NaNO3) .

Ce résultat est conforme à celle montré par l'étude de **(Costa et *al*.2001) ,**il peut être expliquer par le fait que l'azote favorise la multiplication des chloroplastes (ce sont les organites dans lesquelles est contenue la chlorophylle a).

De même, selon Dauesi et *al* 2001 , on signale que le taux de chlorophylle a chez *Arthrospira platensis* augmente lorsque l'azote est introduit dans le milieu de culture et que la chlorophylle a change en fonction de concentration en biomasse . Aussi On observe une diminution de taux de croissance et de teneur en chlorophylle a en parallèle avec le carence en azote dans le milieu (diminution de NaNO3) ce qui confirme l'étude de **(Lamiela et Marquez , 2000)** qui montre que le taux chlorophyllien chez la spiruline est en fonction de la concentration en biomasse dans le milieu de culture .

Pour l'accumulation des lipides .De cet histogramme, on observe que les valeurs de taux lipides trouvés (9.15 %; 4 %; 1.58%) appartient à l'intervalle de la norme(4 à17%) **(T.Souccar 2010, Griffiths,2009,Mata 2010).**

L'analyse des résultats à partir de l'histogramme montrent clairement que les teneurs des lipides sont faibles 1.58% en condition normal(milieu Zarrouk standard) alors que le milieu stressant privé de NaNO3, constitue un milieu de production favorable pour l'accumulation des lipides par la spiruline selon**(Converti et *al* .2009 ;Kate E.Baunillo et *al* 2012)** où on observe que la culture de l'algue dans un milieu stressant (0.03 g/l NaNO3) résulte un taux des lipides (9.15%) supérieure de celui obtenu avec le deuxième milieu stressant de 0.1g/l d'azote (4%).

On constate que la meilleure production des lipides chez la spiruline et celle cultivée sous un stress par privation maximale d'azote en milieu M0.03g/l NaNO3 qui représente un taux six fois plus que le taux des lipides produits en culture de reférence Mz et deux fois plus que le taux des lipides produits en culture M 0.1g/l NaNO3 .ce résultat est en accord avec celle montré par **(Tedesco et Duerr 1989 ;Shifrin et Chisholm 1980, Kost et *al*. 1984, Thomas et *al*. 1984, Ben-Amotz et *al*. 1985, Harrison et *al*. 1990, Chen et Johns 1991).**

On peut dire que le stockage et l'accumulation des lipides chez les microalgues résulte d'un déséquilibre transitoire entre le flux de carbone issu de la photosynthèse et le flux d'autres éléments nécessaire à la croissance comme l'azote **(Taleb 2015).**Aussi on conclure que l'azote à été prouvé pour l'augmentation de l'accumulation des lipides ; en fait la teneur en lipides des cellules algales ne devrait pas être corrélée à la biomasse produite mais aux conditions nutritionnelles dans le milieu comme (carence en azote) .Ces résultats sont similaires avec ceux remportés par plusieurs auteurs **(Kate E.Bannillo et *al* .,2012)**

II.3.4 : Effet de source de carbone organique (mélasse) sur la croissance ; taux de chlorophylle a

II. 3.4.1 . Influence de mélasse sur la croissance cellulaire

La production de biomasses obtenues à différentes concentrations de mélasse est présentée dans la figure II.12

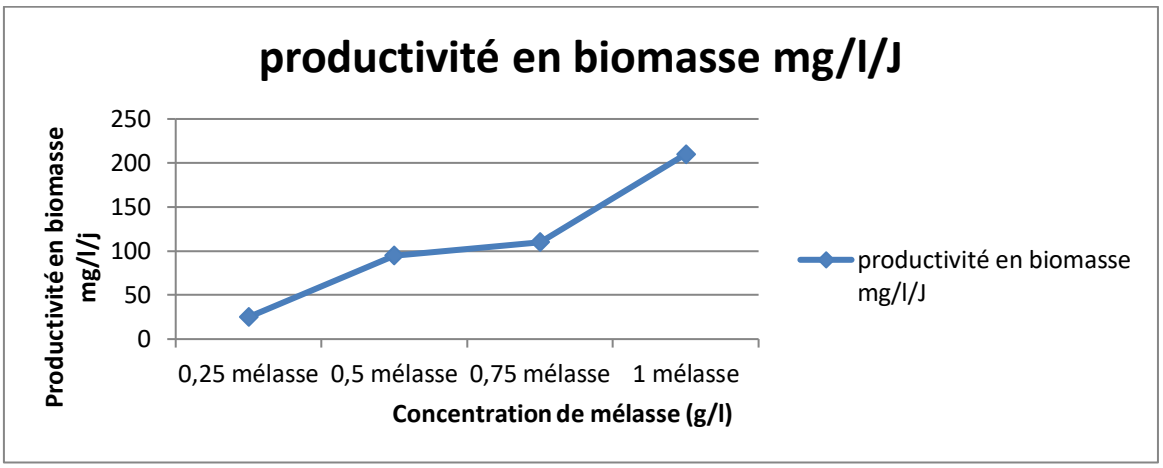


Figure II.12 : Effet de concentration de la mélasse sur la productivité en biomasse de la spiruline .

De ce graphe ,on remarque que Les valeurs de la productivité (25 ;95 ;110 ;210 g/l/J) sont proportionnelles avec l'augmentation de concentration mélasse dans milieu qui sont (0.25g /l, 0.5g/l , 0.75 g/l, 1g/l) respectivement. Alors la mixotrophie en utilisant les glucides (mélasse) comme source de carbone et d'énergie favorise la croissance.

II .3.4.2. Influence de mélasse sur la teneur en chlorophylle a

L'effet de source de carbone sur la teneur en chlorophylle a est montré dans la figure II.14

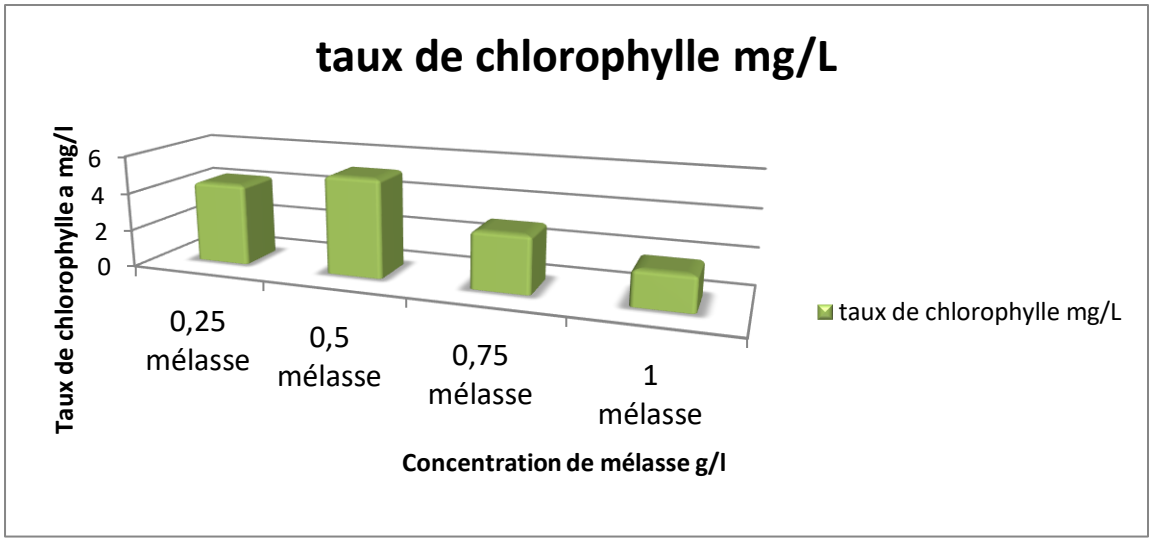
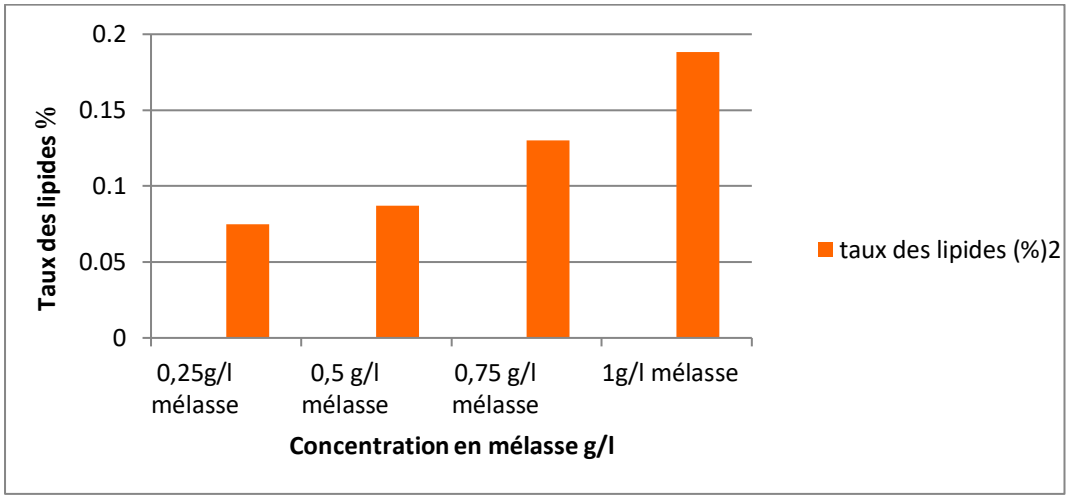


Figure II.14 : Effet de concentration de mélasse sur taux de chlorophylle a.

Les résultats montrent que le taux de chlorophylle a augmente proportionnellement avec l'augmentation de concentration de mélasse dans le milieu jusqu'à la concentration de 0.5 g/l ,puis diminue pour les concentrations 0.75g/l et 1g/l de mélasse ,cela peut être du au milieu alcaline,ce résultat est en accord avec celle de **(R.Dineshkumar et *al* 2015)** où 1g de mélasse a un effet répressif sur la réaction de photosynthèse et l'accumulation de la chlorophylle a .

II.3.5. Effet de mélasse sur la teneur lipidique



Figur II.14 : Effet de concentration de mélasse sur la teneur en lipides

D'après la figure II.14 les valeurs de taux des lipides(7.5 %;8.69 %;13% ;18.84%) pour les concentrations de mélasse (0.25 ;0.5 ;0.75 ;1 g/l) respectivement , on remarque que la teneur lipidique de la spiruline augmente proportionnellement avec l'augmentation de source de carbone (mélasse) dans le milieu avec une accumulation maximale des lipides (18.84%) qui correspond à 1g/l de mélasse ;ces résultats sont similaires a celle décrits par **(Antonio.A**

Martins ,2016) . De cet effet cette concentration de la mélasse est prise pour le reste d'expériences comme source de carbone pour la croissance de la spiruline .

II. 3.6. Effet de la lumière sur le taux de chlorophylle a, productivité en biomasse

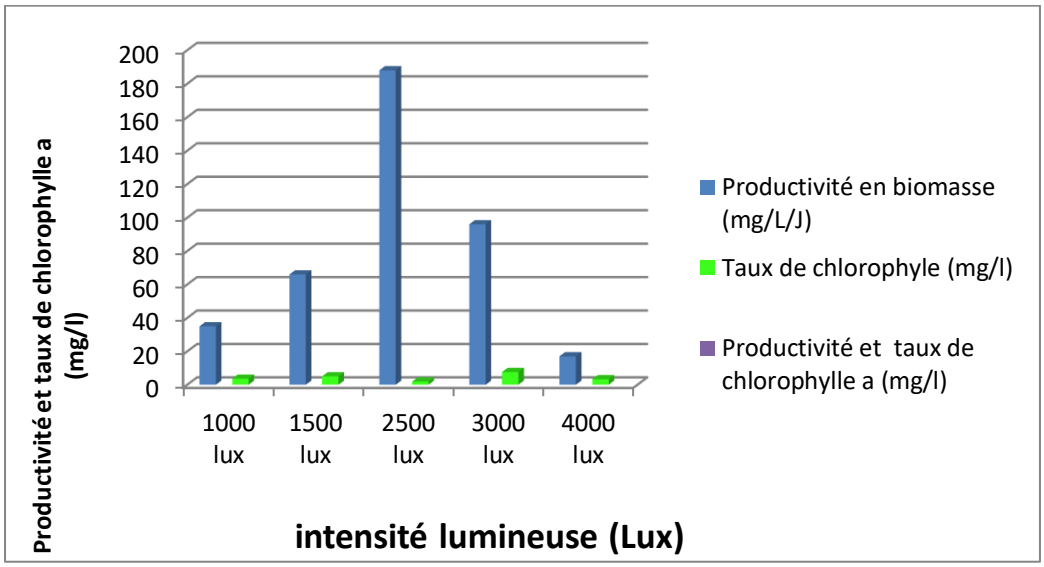


Figure II.15 : Effet de l'intensité lumineuse sur la teneur de chlorophylle el la productivité en biomasse

Suivant l'histogramme ci-dessus ; on observe que Les niveaux d'éclairage à 4000 lux et 2500 lux donnent respectivement les productions de biomasse la plus faible et la plus élevée (17 g/l/J et 188 g/l/J). La croissance devient lente à partir de 2500 lux et la productivité est faible c'est à dire au-delà de cette valeur la lumière devient un facteur inhibiteur (a un effet de photolyse). ALORS Le niveau d'éclairage optimal est exactement de 2500 lux, ce résultat est en accord avec l'étude de **Zarrouk 1966** sur l'algue *Spirulina maxima* .

A partir de la figure II.15, on remarque que le taux de chlorophylle a est variable (3.63 mg/l ;5.049g/l ;1.87mg/l ;7.59mg/l ;3.28mg/l) pour une intensité lumineuse de (1000 lux ;1500lux ;2000lux ;2500lux ;30000lux) respectivement et le niveau d'éclairement maximal pour la croissance de la spiruline a 3000 lux ;ce résultat est similaire a celle décrit par Dansei et *al* 2004 ;Richmond 1986 .le taux de chlorophylle (ch a) faible peut être due au fait que l' intensité lumineuse appliqué (1000,1500,2500 ,4000lux)

lors l'expérimentation n'attient pas la zone de saturation, sachent que au-delà de 3000 lux , l'intensité lumineuse à un effet négatif sur le contenu chlorophyllien (chlorophylle a) qui est un paramètre essentiel pour la photosynthèse peut entraine des dommages de l'appareil photosynthétiques (PSI ; PSII). **Nishiyama et *al* 2006**.Aussi ,**Panday et *al* 2010** , démontré que l'intensité lumineuse un des principaux facteurs influençant le contenu chlorophyllien dans la biomasse la spiruline.

La réduction de taux de chlorophylle a à intensité élevé est une stratégie de protection des microalgues.

II.3.7. Effet de la lumière sur l'accumulation des lipides

La figure II.16 .présente l'évolution de la productivité et du taux de chlorophylle a en fonction de l'intensité lumineuse

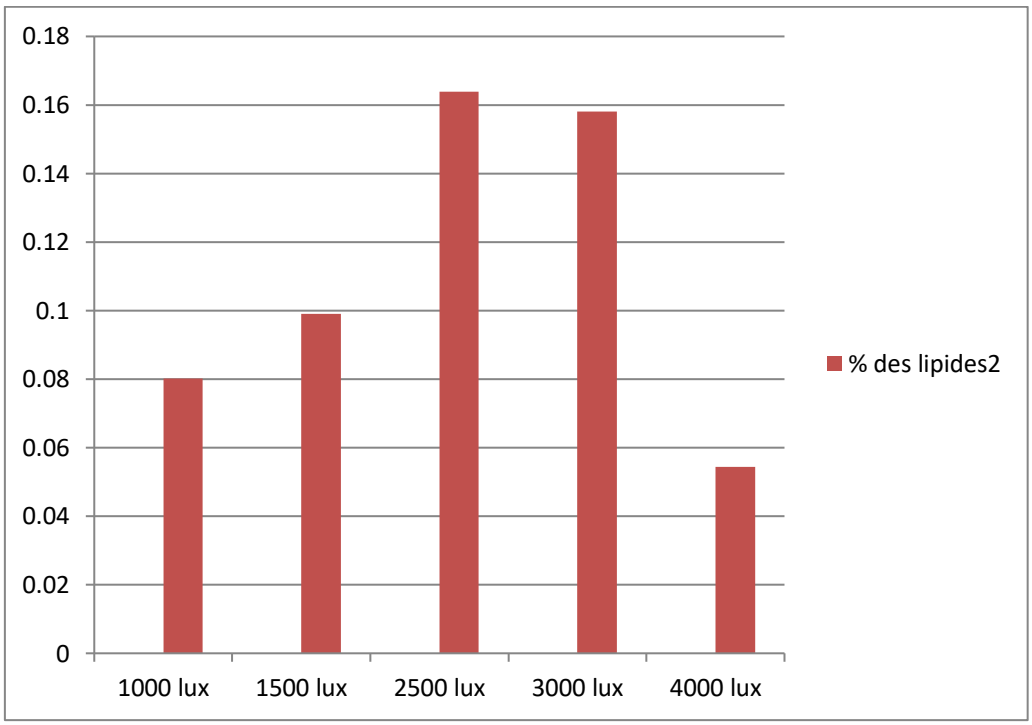


Figure II.16 : Effet de l'intensité lumineuse sur la teneur lipidique de la spiruline

A travers ce Histogramme ; on observe que la teneur lipidique chez la spiruline augmente potentiellement jusqu' une intensité lumineuse de 2500 lux ou atteint un pourcentage de 17.38 % ;puis a partir de cette intensité le taux des lipides régresse progressivement . Les teneurs en lipides enregistrent une baisse lorsque les cultures sont exposées à un éclairement élevé (**M .Tahiri .2000**) . Selon ces résultats, la meilleure intensité lumineuse pour favoriser l'accumulation des lipides chez la spiruline est 2500 lux, pour cette raison on applique cette intensité pour le reste d'expériences pour amélioré la production des lipides.

II.3. 8. Effect de la température sur la productivité et la teneur en chlorophylle a

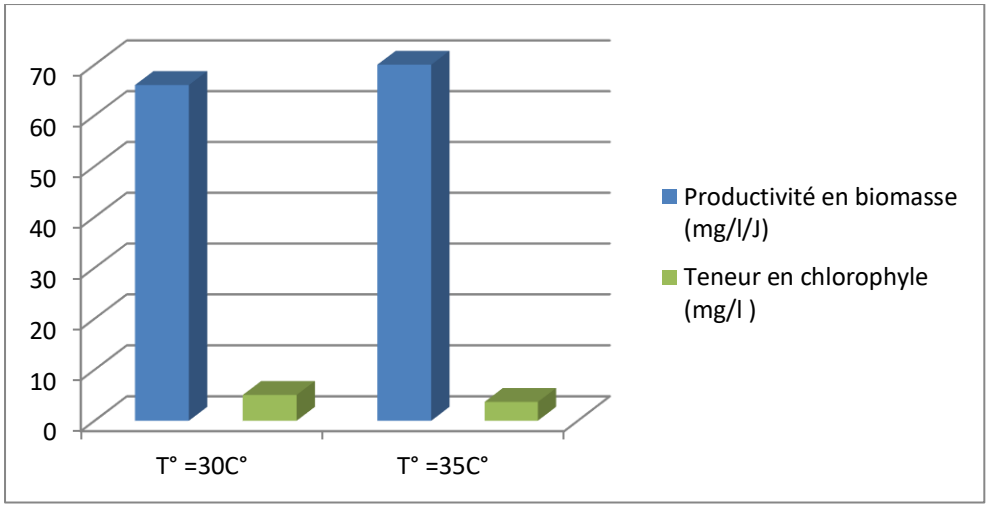


Figure II.17 : Effet de température sur la productivité en biomasse et la teneur en chlorophylle

Suivant l'histogramme (figure II.17) ci-dessus ; la productivité en biomasse chez la spiruline à une T°=35°C est supérieur de celle de la culture exposée à T°=30°C. Alors la température maximale pour la meilleure productivité en biomasse est 35°C ce qui est conforme à la température optimale pour la croissance de la spiruline obtenue par Colla et *al* et Ogbonda et *al* . Par ailleurs, la température à 30°C a un effet négatif sur la production en biomasse et un effet favorable sur la production des protéines, des lipides ,chlorophylle et des composés phénoliques.

Ces valeurs restent proches de celles trouvées par Ahlgreen (1987) et celles reportées par Oh et Rhee (1991) pour l'algue *Scenedesmus crassus Chodat* alors que Richmond 1988 indique que la température optimale était de 35 à 37 ° C et la croissance de différents types de spiruline à 40 ° C était néfaste. Tedesco et Duerr (1989) ont déterminé que la température optimale pour *S. platensis* était de 35 ° C. De même dans cette étude, la température optimale pour la croissance de la biomasse était de 35 ° C.

Pour le contenu chlorophyllien

Les résultats expérimentaux montrent que le taux de chlorophylle a diminue inversement avec l'augmentation de T° de milieu de culture .les valeurs (5.049 mg/l ;3.68 mg/l) sont trouvées pour T°= 30°C et T°=35°C réspectivement .

Selon Coesel et *al*. (1994), la faible photo inhibition obtenue dans le cas de la photosynthèse est en relation avec la diminution des teneurs cellulaires en chlorophylle a.La température élevée peut interagir avec les autres facteurs (lumière, osmolarité, PH, agitation et refroidissement. En effet durant le stress thermique l'énergie de maintenance cellulaire supplémentaire joue un rôle très important pour résister à ce stress .

II.3.9. Effet de la température sur le taux des lipides

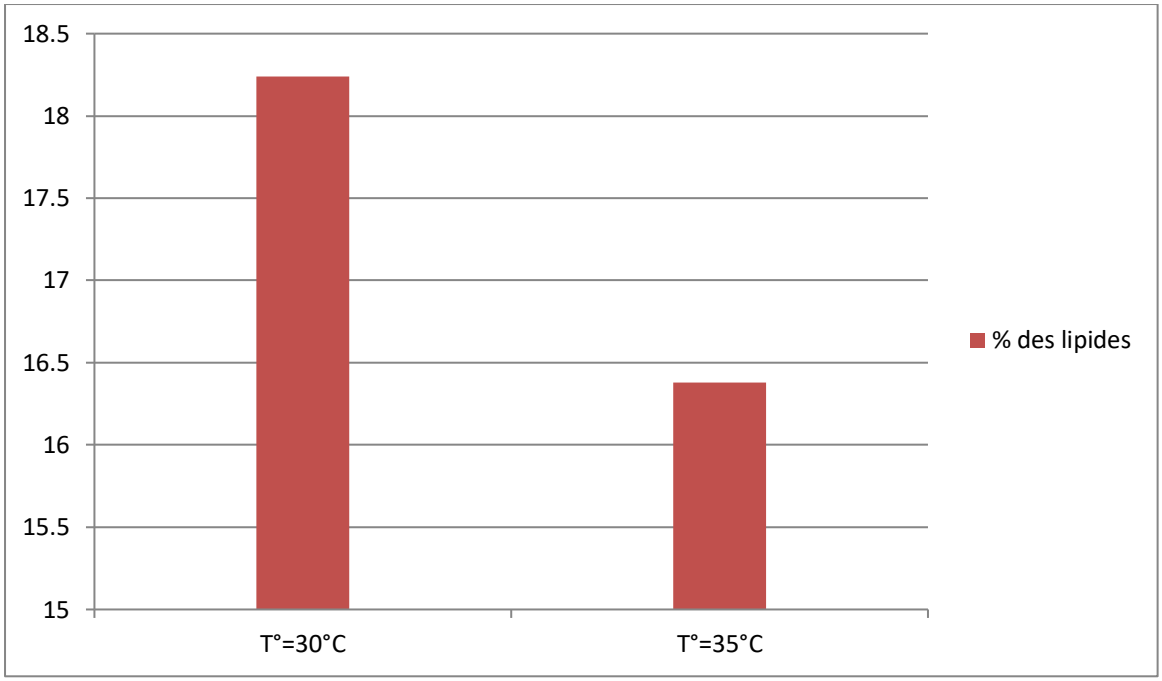


Figure II .18 : Effet de la température sur la teneur lipidique de la spiruline

Parmi les facteurs environnementaux retenus dans cette étude, la température semble avoir le plus de répercussion sur la composition biochimique de la spiruline.

Ce histogramme montre l'influence de la température sur les teneurs en lipides de la spiruline, l'accumulation la plus élevé en lipide est observé à une température de (30°C). Des comportements similaires ont été signalés chez d'autrs espèces d'algues **(Tedesco et Duerr 1989, Tan et Johns 1991, Thompson et *al*. Í992)** . la température est un paramètre important pour l'accumulation des lipides chez les algues (**Aaronson 1973, Tedesco et Duerr 1989, Tan et Johns 1991).** Une diminution de température allant jusqu'à 4°C-15°C environ, permet d'obtenir des lipides plus insaturés alors qu'une augmentation de température allant jusqu'à 40°C environ, permet d'obtenir des lipides saturés **(Liliana et *al*,.2008).**

La température semble avoir un effet majeur sur la composition lipidique. Une augmentation de température tend généralement à augmenter la proportion d'acides gras saturés et inversement **(Hu 2008).**

Conclusion

Conclusion

les microalgues représentent aujourd'hui une grande voie de recherche à approfondir. Les problèmes liés au réchauffement climatique attirent le regard vers ces microorganismes capables de consommer le CO_2 présent dans l'atmosphère pour produire de la biomasse contenant des acides gras utilisés pour la fabrication des biocarburants **(Taleb, 2015).**

Le but de ce travail était d'évaluer l'influence de la culture en milieu épuisé en azote sur la productivité en biomasse ; taux des lipides et le taux de chlorophylle a chez la spiruline. La première étape consistait à favoriser une productivité maximale de biomasse via une culture dans un milieu supplémenté de mélasse. La seconde à permettre une accumulation maximale en lipide via une carence en source d'azote et un stress thermique et lumineuse.

La conclusion que nous pouvons tirés de notre expérience sur la culture da la spiruline

- La culture d'*Arthrospira platensis* dans un milieu épuisé en azote permet d'obtenir une production de biomasse faible à celle obtenue dans le milieu synthétique de référence (milieu Zarrouk) caractérisée par une teneur en chlorophylle a élevée et une meilleure accumulation des lipides.
- La culture en mixotrophie favorise la croissance et la production des lipides.
- L'augmentation de l'intensité lumineuse et de la température favorise la productivité en biomasse ; le taux de chlorophylle a ; la teneur lipidique .
- A partir de 3000 lux et de 35°C, la lumière et la température ont un effet indésirable sur ces paramètres.

On constate que les conditions de carence en azote ; un gramme de mélasse ; une T=30°C et une intensité lumineuse de 2500 lux sont efficaces pour stimuler une meilleure production des lipides par la spiruline.

Perspectives

Finalement, dans ce travail, l'évaluation des conditions favorables pour l'accumulation des lipides ne suffit pas. Ceci suggère aux prochaines études de :

- Vérifier les paramètres de qualité pour l'huile extraite à savoir : l'indice de réfraction, le pH, la densité et de la viscosité.

-Analyse des acides gras par CPG.

-Synthétiser le biodiesel à partir d'huile d'*Arthrospira platensis* par la transestérification

-Assemblage de la quantité maximale d'huile d'algue *Arthrospira platensis* pour la production d'une grande quantité de biodiesel.

-Procéder plus d'analyse pour le biodiesel comme (point d'éclair, point d'inflammation..)

-Synthétiser du biodiesel par différentes manières

- Appliquer le biodiesel dans les moteurs diesel.

Références bibliographiques

A

Ahounou ,M-N ., 2018 . La spiruline : un complément alimentaire en conseil à l'officine. Enquête d'utilisation , diplôme d'état de docteur en pharmacie, université de ROUEN UFR de medecine et de pharmacie-France

Abreu Ana , 2012."Mixotrophic cultivation of Chlorella vulgaris using industrial dairy waste as organic carbon source.," *Bioresour. Technol.* , vol. 118, pp. 6-61

Ale, M. Pinelo, and A. S. Meyer,2014. "ASSESSING EFFECTS AND INTERACTIONS AMONG KEY VARIABLES AFFECTING THE GROWTH OF MIXOTROPHIC MICROALGAE: pH, INOCULUM VOLUME, AND GROWTH MEDIUM COMPOSITION," *Prep. Biochem. Biotechnol.* , vol. 44, no. 3, pp.242-256.

Anita Kirrolia & Narsi R. Bishnoi & Rajesh Singh; 2014. Response surface methodology as a decision-making tool for optimization of culture conditions of green microalgae Chlorella spp. for biodiesel production; Ann Microbiol . 64:1133–1147

Antenna technologies. Malnutrition: Spiruline données scientifiques 2009. Disponible sur https://www.antenna-france.org//wp-content/uploads/2014/06/spiruline-donnees-scientifiques.pdf (dernière consultation Novembre 2017)

Attilio Converti ∗, Alessandro A. Casazza, Erika Y. Ortiz, Patrizia Perego, Marco Del Borghi,2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of Nannochloropsis oculata and Chlorella vulgaris for biodiesel production, Chemical Engineering and Processing 48 (1146–1151).

B

Ballot, A. (2004). Cyanobacteria in Kenyan Rift Valley lakes – A biological and toxicological study. Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften (Dr.rer. nat.) eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin .

Bashan, and Y. Bashan,2011."Heterotrophic cultures of rnicroalgae: Metabolism and potential products," *WaterRes.,* vol. 45, no. 1, pp. 11-36, Jan. 2011

Baunillo,.K-E,. ROGER ,.S-T,.Higunio,.R ,.Higinio R-B,. Luque.R,2012, Investigations on microalgal oil production from *Arthrospira platensis*: towards more sustainable biodiesel production, RSC Advances,. DOI: 10.1039/C2RA21796A

Bernard C ; 2014. Les cyanobactéries et leurs toxines. *Rev Francoh Lab*;2014:53–68.

Borgne ,1986 .La culture des micro- algues. In: Aquaculture (Technique et Documentation ed), Paris, 181 - 192.

Bujard E, U. Braco, J. Mauron, F. Mottu, A. Nabholz, J. J Wuhrmann et G. Clement ,1970. Composition and nutritive value of blue-green algae (spirulina) and their possible use in food formulations.3rd International Congress of Food Science and Technology, Abstracts Washington. (1970).

Breuer, G., Lamers, P. P., Martens, D. E., Draaisma, R. B., & Wijffels, R. H. (2012). The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. Bioresource Technology,

Brennan L, Owende P,2010. Biofuels from microalgae-a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. Renew Sustain Energy Rev (2010) 14:557–577.

C

Cadoret, J.-P., & Bernard, O. (2009). La production de biocarburant lipidique avec des microalgues, 202(3), 201–211.

Chernova , Korobkova, Kiseleva, and Zaitsev, 2008 .Microalgae as raw material for obtaining biofuel,‖ Al'tern. Energ. Ekol. (9), 68–74 (2008).

Chernova , . Kiseleva, and Popel ; 2014 . Efficiency of the Biodiesel Production from Microalgae; ISSN 0040_6015, Thermal Engineering, (2014), Vol. 61, No. 6, pp. 399–405.

Chibani.A , Annou., H.,2016, Synthèse de biodiesel d'une algue verte. Mémoire master académique en analyse et contrôle de qualité .Université Kasdi Merbah –Ouargla

Chisti, 2008. "Response to Reijnders: Do biofuels from rnicroalgae beat biofuels from terestrial plants," *Trends Biotechnol.*, vol. 26, no. 7, pp. 351-352, Jul. 2008.

Chojnacka Katarzyna, 2004. "Kinetic and Stoichiometric Relationships of the Energy and Carbon Metabolism in the Culture of Microalgae," *Biotechnology*, .

Colla, C. Oliveira Reinehr, C. Reichert, et J. A. V. Costa, « Production of biomass and nutraceutical compounds by Spirulina platensis under different temperature and nitrogen regimes »

Converti A., Casazza.A.A., OrtizE.Y., Perego.P., Del Borghi.M .(2009) . Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis*

oculata and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production, Chemical Engineering and Processing

Costa J, Cozza K, Oliveira L, Magagnin G (2001) Different nitrogen sources and growth responses of Spirulina platensis in microenvironments. World J Microbiol Biotechnol

Cruchot H ,2008 . La spiruline: bilan et perspectives. Thèse d'exercice. Université de Franche-Comté. Faculté de médecine et de pharmacie.

D

Danesi E.D.G, Rangel C.O, Pelizer L.H, Carvalho J.C.M, Sato S, Moraes I.O. (2001) Production of *Spirulina platensis* under different temperatures and urea feeding regimes for chlorophyll attainment. In: Proceedings of the Eighth International Congress on Engineering and Food.

Danesi, E.D.G.,Rangel Y.C.O.,Carvalho,J.C.M.and Sato, S.(2004).Effect of reducing the light intensity on the grouwth and production of chlorophyll by Spirulina platensis Biomass and Bioenergy.

Dansou D- K.,2002 , Développement de la culture de la spiruline (*Spirulina platensis)* et valorisation de celle - ci au BURKINA FASO .Diplôme d'études supérieures spécialisées en industries agro-alimentaires

Dineshkumar , Palanivel Jayasingam , Pitchai Sampathkumar.(2015).Enhance the growth of Spirulina platensis using molasses as organic additives.

Dong, Eric. Knoshaug, Ryan Davis, Lieve .Laurens, Stefanie VanWychen,2016
Philip T. Pinkos , NickNagle, Combined algal processing: A novel integrated biorefinery process to produce algal biofuels and bioproducts, Algal Res (2016).

Dordrecht Z. Fang et al. (eds.) (2015). Production of Biofuels and Chemicals with Microwave, Biofuels and Biorefineries 3, 145-167.

F

Falquet et al ,J.-P., Hurni. 2006 , Spiruline Aspects Nutritionnels Antenna Technologies.

Fox RD ; 1999. La spiruline: technique, pratique et promesse. Aix-en-Provence: Edisud; 1999.

G

Gao, Y. Zhai, . Ding, and Q. WU, 2010. "Application of sweet sorghum for biodiesel production by heterotrophic microalga Chlorella protothecoides," *Appl. Energy*, vol. 87, no. 3, pp. 756- 761 , Mar. 2010.

Gordillo, F., Goutx, M., Figueroa, F., & Niell, F. (1998). Effects of light intensity, CO 2 and nitrogen supply on lipid class composition of Dunaliella viridis. *Journal of Applied …*, 135–144.

Guschina, I. a, & Harwood, J. L. (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research*, *45*(2), 160–86. doi:10.1016/j.plipres.2006.01.001

Guihéneuf, F., Fouqueray, M., Mimouni, V., Ulmann, L., Jacquette, B., & Tremblin, G. (2010). Effect of UV stress on the fatty acid and lipid class composition in two marine 249 microalgae Pavlova lutheri (Pavlovophyceae) and Odontella aurita (Bacillariophyceae). Journal of Applied Phycology.

H

Habib MA., Parvin M, Huntington T., Hasan M. *Review on culture, production and use of spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish*. Rome: 2008. Disponible sur ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0424e00.pdf (dernière consultation septembre 2017)

Hamd Berna, 2009.Transestérification des huiles végétales par l'éthanol en conditions douces par catalyses hétérogènes acide et basique, thèse doctorat, 2009, p : 10-31

Ho, S., Ye, X., Hasunuma, T., Chang, J., & Kondo, A. (2014). Perspectives on engineering strategies for improving biofuel production from microalgae — A critical review.

Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., & Darzins, A.(2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. *Plant Journal*, *54*(4), 621–639. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x

L

Li. Xu, and WU, 2007."Large-scale biodiesel production from microalga Chlorella protothecoides through heterotrophic cultivation in bioreactors," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 98, no. 4, pp. 764-771, Nov. 2007.

Liu, Huang, Sun, Zhong, Jiang, and Chen, 2011. "Differentiallipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic Chlorella zofmgiensis: Assessment of algal oils for biodiesel production," *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. l,pp. 106-110, Jan. 2011.

Lumilla. M., Ladislava.M., Jarmila.V. A., Jana. O., Jirim., Jiri.S., Tunde J.(2015). Phenolic Content and Antioxidant Capacity inAlgal Food Products. Molecules.

M

Mata, A. A. Martins, and N. S. Caetano, 2010. "Microalgae for biodiesel production and other applications: A review," *Renew. Sustain. Energy Rev.,* vol. 14, no. l , pp. 217-232, Jan.2010

Meng X, Yang J, Xu X, Zhang L, Nie Q, Xian M,2009. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. Renewable Energy (2009), 34: 1–5.

Michaud .J-C,2016 , strategie de culture algale en deux étapes afin de produire des biocarburants, mémoire prsenté à l'université du QUÉBEC à Trois-riviéres, France

Mitra, (Hans) van Leeuwen, and B. Lamsal, 2012."Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous Chlorella vulgaris on industrial co-products," *Algal Res.,* vol. 1, no. 1, pp. 40-48, May 2012.

Morris I., Glover E. & Yentsch C.S. 1974. Products of photosynthesisby marine phytoplankton : the effect of environmental factors on the relative rates of protein and carbohydrate synthesis.

Moser and Vaughn, 2012."Efficacy offatty acid profile as a tool for screening feedstocks for biodiesel production," *Biomass Bioenergy,* vol. 37, pp. 31-41, Feb.2012

Mubarak , Shaija ,Suchithra,2015. A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production, Algal Research , Volume 7, (January 2015), Pages 117–123.

MUHLING.M.(2000). Characterization of Arthrospira (Spirulina) strains., Durham theses, Durham University.

N

Nishijima T., Shiozaki R. & Hata Y. 1979. Production of vitamin B1 2 , thiamine and biotin by freshwater phytoplankton. *Bulletin of the Japanese Society for Scientific Fisheries.*

O

Ogbonda, R. E. Aminigo, et G. O. Abu, « Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative Spirulina sp. »

Tedesco M.A. & Duerr E.O. 1989. — Light, temperature and nitrogen

starvation effects on the total lipid and fatty acid content and composition of *Spirulina platensis* UTAX 1928.

P

Pandey, J.P.,Neeraj Pathak , Amit Tiwari.(2010). Standariization of pH and Light Intensity for the Biomasse Production of *Spirulin Platensis* .J.Algal Biomasse Utln .

Pienkos P, Darzins A,2009. The promise and challenges of microalgal-derived biofuels. Biofuels Bioprod Bioref (2009) 3: 431–440.

Pittman, ,Dean, and Osundeko,2011. "The potential of sustainable algal biofuel production using waste water resources," *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 1, pp. 17-25, Jan. 2011.

Prafulla D. Patil and Shuguang Deng,2015. Microwave-Enhanced In Situ Transesterification of Algal Biomass to Biodiesel, Springer Science+Business Media.

Pruvost,Van Vooren ,Cogne, and Legrand, 2009. "Investigation ofbiomass and lipids production with Neochloris oleoabundans in photobioreactor," *Bioresour. Technol.*, vol. 100, no. 23, pp. 5988-5995, Dec. 2009.

Q

Quoc ,.K-P , Dubacq,. J-P , Justin,.A-M ,. Demendre,.C,.Mazliak,.P.,1993 , Biosynthesis of eukaryotic lipid molecular species by the cyanobacterium *Spirulina platensis. Rmhirnica et Buphysica Acta,1168(1993)94-99,*Elsevicr Science Publishers B.V .

R

Ras, M., Steyer, J., & Bernard, O. (2013). Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production. Reviews in Environmental Science and Biotechnologies, 153–164.

Renaud S.M., Parry D.L., Thinh L.V., Kuo C , Padovan A. et SammyN. **1991**.Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp. and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture.

Richmond, A. and J.U. Grobbelaar.(1986). Factors affecting the output rate of Spirulina platensis with reference to mass cultivation.

Richmond,2008. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. John Wiley & Sons, 2008.

Roleda, M. Y., Slocombe, S. P., Leakey, R. J. G., Day, J. G., Bell, E. M., & Stanley, M. S. (2013). Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. Bioresource Technology.

S

Sandesh Kamath B; 2007; "Biotechnological production of microalgal carotenoids with refrece to astaxanthin and evaluation of its biological activity"; doctoral thesis; PP. IV

Sguera S,2008. Spirulina platensis et ses constituants : intérêts nutritionnels et activités thérapeutiques. Thèse d'exercice. Université de Nancy I. UFR Sciences pharmaceutiques et biologiques, 2008.

Siaut, M., Cuiné, S., Cagnon, C., Fessler, B., Nguyen, M., Carrier, P., … Peltier, G. (2011). Oil accumulation in the model green alga Chlamydomonas reinhardtii: characterization,variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves.*BMC Biotechnology*, *11*(1), 7. doi:10.1186/1472-6750-11-7

Shifrin N.S. & Chisholm S.W. 1980. Phytoplankton lipids: environmental influences on production and possible commercial applications.In *Algae Biomass,* 5helef G. et Soeder C.J. (Eds.), Elsevier Press, Amsterdam.

Shifrin N.S. & Chisholm S.W. 1981. Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles.

Souccar A. Periault, P. Trembalais, N. Elvir, V. Molean – la nutrition. Edi Axis Media (1992) www. Lanutrition.fr/ alimentsindex.php Consulté le 10/04/2010.

T

Taleb A., (2015) .Production de biodiesel à partir des microalgues : recherche des souches accumulatrices des lipides et optimisation des conditions de culture en photobioréacteurs, these de doctorat, L'Université Nantes, France.

Tan C.K. & Johns M.R. 1991. Fatty acid production by heterotrophic *Chlorella saccharophila. Hydrobiologia.*

Tedesco MA, Duerr EO (1989) Light, temperature and nitrogen starvation effects on the total lipid and fatty acid content and composition of Spirulina platensis UTEX 1928. J. Applied Phycol.

Thompson P.A., Guo M-x. & Harrison P.J. 1992. Effects of variation in temperature. I. On the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton.

V

Vidalo J-L,2008. *Spiruline: l'algue bleue de santé et de prévention*. Paris: Ed. du Dauphin; 2008.

Vonshak A,1997. *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology, and biotechnology*. London: Bristol, PA: Taylor & Francis; 1997.

W

Who ,1999. Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. London: E & FN Spon; 1999.

X

Xu, X. Miao, and Q. WU, "High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella* protothecoides by heterotrophic growth in fermenters," *J Biotechnol.* , vol. 126, no. 4, pp. 499-507, Dec. 2006.

Y

Yangmin Gong , Mulan Jiang, 2011. Biodiesel production with microalgae as feedstock: from strains to biodiesel, Biotechnol Lett (2011) 33:1269–1284

Yen,Hu, Chen, S.-H. Ho, Lee, and Chang,2013."Microalgae-based biorefmery - From biofuels to natural products," *Bioresour.Technol.,* vol. 135, pp. 166-174, May 2013.

Z

Zarrouk, C.(1966). Contribution à l'étude d'une cyanophycée : influence de divers Facleurs physiques et chimiques sur ta croissance et la photosynthèse de Spirulina maxima (Setch elGardner} Geitler, Thèse présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Paris).

Zhang, Su, Zhong, Zhang, Shen,SangYan, and Zhou,2012."The effect of bacterial contamination on the heterotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* in wastewater from the production of soybean products," *Water Res.*, vol. 46, no. 17 , pp . 5509-5516, Nov.2012

Zighmi.S ,2017.Production de biodiesel et optimisation des paramètres des procédés de culture des microorganismes. Doctorat Sciences en : Génie des Procédés.Université Kasdi Merbah -Ouargla-Algerie.

Annexes

Annexe I :

-Matériels non biologiques :

Les différents matériels et appareillages de laboratoire utilisés sont présentés ci-dessous :

1 .Appareillages :

- Balance (KEREN ALS 220-4N)
- Luxmètre (1308SI)
- Bain-marie (THERMOFIN)
- Centrifugeuse (EBA 21)
- Etuve
- Microscope optique (OPTIKA microscope)
- Agitateur (XH-B)
- Spectrophotomètre(UV-2005J.Pselecta.sa)
- pH mètre(KY-PH-002)
- Programmateur journalier a curseurs, Programmateur électronique hebdomadaire,
- Pompe air aquarium, Accessoires de pompe à air SP-602F, lampe torche (18w).
- Thermostats (XILONG 25W)
- Rotavapeur
- Chauffe-ballon
- Appareil de Soxhlet

2. Verreries et petits matériels

- Pipettes graduées (1ml, 5ml, 10ml)
- Béchers : 50ml, 600ml, 1000ml
- Lames, lamelles
- Tubes à essai
- Flacons (250ml ,500ml)
- Compte gouttes, papier filtre de type Whatman N°4 de porosité 13 micromètre,spatule, pissette, entonnoir, thermomètre, Tuyau à air en silicone 4/6.
- Eppendorf tubes 2ml
- Ballon

3.Produits utilisés :

- ✓ Produits chimiques :

Méthanol, chloroforme, Crystal violet , lugol, éthanol, fushine ,eau distillée

- ✓ Milieu de culture : Milieu Zarrouk

Annexe II :

Tableau 1 : le contenu en lipides des diverses espèces

Oil content of some microalgae

Microalga	Oil content (% dry wt)
Botryococcus braunii	25–75
Chlorella sp.	28–32
Crypthecodinium cohnii	20
Cylindrotheca sp.	16–37
Dunaliella primolecta	23
Isochrysis sp.	25–33
Monallanthus salina	>20
Nannochloris sp.	20–35
Nannochloropsis sp.	31–68
Neochloris oleoabundans	35–54
Nitzschia sp.	45–47
Phaeodactylum tricornutum	20–30
Schizochytrium sp.	50–77
Tetraselmis sueica	15–23

Annexe III :



Figure 1 : cas de photolyse et formation des exopolysacharides

Annexe IV :



Figure 2 : extrait des lipides (cas de carence en azote

Annexe V :



Figure 3: La récolte ; la filtration et le séchage de la spiruline

Annexe VI :

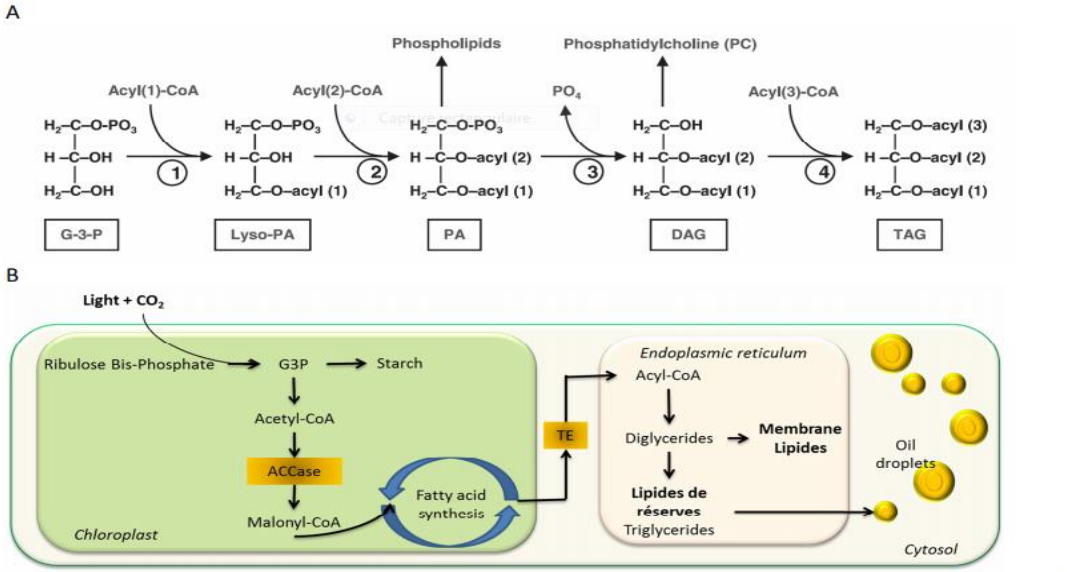


Figure 4 : A) Schéma simplifié de la synthèse des différents lipides complexes (Hu et al., 2008). B) Vision d'ensemble des voies d'anabolisme des lipides (G3P : glyceraldehyde 3 phosphate ; ACCase : acetyl-CoA carboxylase ; TE : thioestérase ; modifié à partir de (Ho et al., 2014).

Annexe VII :

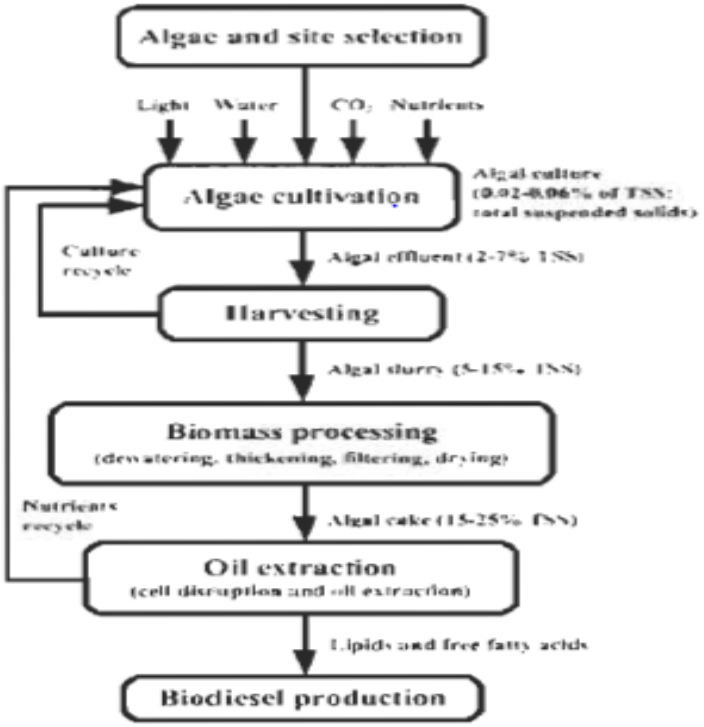


Figure 5 : Stades de production de biodiesel à partir de biomasse algale. **(JEAN-CHARLES MICHAUD,2016)**

Annexe VIII

Tableau VIII.1 : Composition chimique du milieu Zarrouk **(Fox , 1999).**

Composition	Concentration (g/l)
$NaHCO_3$	16.80
$K2HPO_4$	0.50
$NaNO_3$	2.50
K_2SO_4	1.00
NaCl	1.00
$MgSO_4.(7H_2O)$	0.20
$CaCl_2$	0.04
$FeSO_4.(7\ H_2O)$	0.01
EDTA	0.08

A 1 L de la composition ci-dessus, on a ajouté 1 ml de chacune des solutions d'oligo-éléments$A5$ et $B6$

Tableau VIII.2 : Composition chimique de la solution $A5$ **(Fox, 1999).**

Composition	Concentration (g/l)
H_3BO_3	**2.86**
$MnCl_2.4\ H_2O$	**1.81**
$ZnSO_3$	**0.22**
$CuSO_4$	**0.08**
MoO_3	**0.01**

Tableau VIII.3 : Composition chimique de la solution *B*6 (**Fox., 1999).**

Composition	Concentration (g/l)
$K_2Cr\ (SO_4)_4.24H_2O$	960×10-4
$NiSO_4.7H2O$	478×10-4
$Ti_2(SO_4)_3$	400×10-4
NH_4VO_3	229×10-4
Na_2WO_4	179×10-4
$Co\ (NO_3)_2.6H_2O$	44×10-4