

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة البليدة 1
Université Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologie et Agro-Ecologie

Laboratoire des Sciences Animales & Recherche en Biobanking
Laboratoire de Biotechnologie de Productions Végétales

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme d'un Master Académique

Option

Biotechnologie et Pathologie Moléculaire

Thème

OPTIMISATION DE LA CULTURE DES MICROALGUES

Présenté par

M^{elle} KHOUNI Warda

M^{elle} MAHROUK Sara

Devant le Jury :

<i>Mr. BOUKHATEM MN</i>	<i>Professeur</i>	<i>SNV, Blida1</i>	<i>Président</i>
<i>Mme. ROUAKI F</i>	<i>Maitre de conférences A</i>	<i>SNV, Blida1</i>	<i>Examinatrice</i>
<i>Mme. RAHIM I</i>	<i>Maitre de conférences A</i>	<i>SNV, Blida1</i>	<i>Promotrice</i>

Session 2024 / 2025

Remerciements

« Ressentir de la gratitude sans l'exprimer, c'est comme emballer un cadeau et ne pas le donner. » William Arthur Ward

Avant toute chose, nous rendons grâce à Allah, Le Tout-puissant, Le Miséricordieux qui, nous a accordé la santé, la patience et le courage nécessaires pour mener à bien ce travail.

Nous souhaiterions, à travers ces quelques lignes, exprimer notre profonde gratitude à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

*Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à notre promotrice **Dr .RAHIM IBTISSEM .**, pour nous avoir donné sa confiance, pour son soutien moral, son expertise et ses orientations tout au long de ce travail ainsi que pour le temps qu'elle a consacré à cette modeste étude. Vous avez toujours été disponibles pour nous .Nous exprimons ici toute notre reconnaissance.*

*Nous adressons également nos sincères remerciements aux membres de jury. A **Pr. BOUKHATEM MN.**, qui nous a fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire en qui on salue l'humanité, la conscience et l'excellence scientifique, **Dr .ROUAKI F .**, d'avoir lui aussi accepté d'examiner notre travail*

*A Mme **DJAZOULI-ALIM**, Professeur a USDB1, chef d'option de spécialité Biotechnologie et Pathologies Moléculaires, pour nous avoir assuré un cursus de Master passionnant et très enrichissant.*

*Nos sincères remerciements s'adressent aux ingénieurs des laboratoires : **Mme Ihcene, Rachida, Hassina** pour leur disponibilité et leur aide précieuse tout au long de notre travail.*

*Un remerciement tout particulier à **Madame Sabah**, ingénieur du laboratoire mycologie où nous avons effectué nos travaux pratique, pour son soutien exceptionnel, sa gentillesse, sa disponibilité ainsi pour la qualité de son accompagnement, qui ont grandement facilité la réalisation de la partie pratique de notre mémoire .Que dieu vous protège et vous accorde santé, bonheur à vous et votre famille.*

A tous les enseignants que nous avons eu le privilège de croiser durant notre parcours universitaire .Chacun, par sa manière d'enseigner, sa rigueur et son implication, a contribué à notre formation scientifique .Nous leur exprimons toute notre gratitude.

Warda et Sara

Dédicace

A toi, maman,

Douce étoile de mes nuits agitées, source intarissable d'amour et de prières silencieuses. Ton regard suffit à calmer mes tempêtes. Ce travail est le fruit de ta lumière.

A toi, papa,

Pilier discret, force tranquilles, tes silences pleins d'encouragement m'ont portée plus loin que mille mots, ton ombre m'a protégée, même de loin.

A toi walid,

Frère au cœur pur, ton rire, ton soutien, ta simple présence ont été mon ancrage dans les jours de doute.

A ma grand-mère, ton amour simple et ta sagesse murmurée m'ont accompagnée bien plus que tu ne le crois, Que Dieu te garde près de moi, t'accorde une longue vie et une bonne santé.

A vous, Zina, Mounia, Sara et Imane mes chères tantes, vents doux dans mon dos, vos mots, vos sourires ont tissé autour de moi une chaleur inestimable, je vous aime de tout mon cœur

A toute ma famille KHOUNI et KERAGHEL, merci pour votre amour

A mon binôme, mon amie bien-aimée,

Tu as été la première personne que dieu a placée dans ce couloir inconnu. Tu as été là : dans les rires, les peurs, dans les silences remplis de fatigue, tu es la sœur que la vie m'a offerte sans que je la demande. A toi Sara je ne dédie pas seulement ce travail, je t'offre aussi un bout de mon cœur.

En fin ...

*A moi-même, à celle qui a douté, vacillé, parfois pleuré, mais qui a continué d'avancer.
A celle qui s'est relevée à chaque chute, qui a cru, même dans le noir et qui aujourd'hui peut regarder ce travail et dire : « Tu l'as fait et tu peux être fière »*

“This work is a piece of my journey and a piece of my heart ... for you ”

Warda ...♥

Dédicaces

À mes parents

*Aucun mot ne saurait exprimer ce que je vous dois.
Votre amour inconditionnel, vos sacrifices silencieux et votre patience infinie ont été les piliers de mon chemin. Vous avez cru en moi, même quand tout semblait flou, et vous m'avez donné la force d'avancer sans jamais regarder en arrière.
Ce travail est le fruit de vos prières, de vos efforts, de vos nuits blanches à veiller sur moi.
Si j'en suis là aujourd'hui, c'est grâce à vous.
Que Dieu vous protège, vous comble de santé, de paix et de bonheur.*

À mes frères Islam, Farouk, Mohamed et Ilyes

*Merci pour votre présence, votre soutien silencieux et votre affection. Vous avez été une force discrète mais précieuse dans ce parcours.
Que Dieu vous bénisse.*

À mes amies Selma, Anfal, Douaa, Mouna et Sarah

*Merci pour votre amitié, vos encouragements et votre lumière dans les moments difficiles.
Votre bienveillance a compté plus que vous ne l'imaginez.
Avec tout mon cœur.*

À ma chère amie Warda , mon binôme

*Tu as été ma partenaire, ma sœur et ma compagne de route durant l'une des plus belles étapes de ma vie. Tu as été ce pilier sur lequel je me suis toujours appuyée, cette fleur qui a illuminé mes jours. Tu as partagé avec moi la joie, la tristesse et la fatigue. Tu as travaillé avec passion et détermination jusqu'à la dernière minute de notre projet.
Sans toi, il n'aurait jamais été aussi complet, ni aussi beau.
Ta présence a donné à cette aventure une saveur unique.
Aucune parole, aucun vœu ne saurait exprimer toute ma reconnaissance.
Tu es ce cadeau que la vie m'a offert sans que je le demande.*

À moi-même

*À moi, pour avoir tenu bon malgré les doutes et la fatigue.
Pour chaque pas, chaque nuit blanche, chaque effort silencieux.
Tu es allée jusqu'au bout. Sois fière de toi.*

« Derrière chaque réussite, il y a des sacrifices, des larmes, et beaucoup d'espoir. »

Ce travail vise à optimiser les conditions de culture de *Dunaliella salina*, une microalgue halotolérante d'intérêt biotechnologique reconnue pour sa capacité à produire des biomolécules à haute valeur ajoutée, telles que le β -carotène, les acides gras polyinsaturés et les protéines.

Ainsi, une première série d'expériences a été menée pour déterminer la salinité optimale de culture de *Dunaliella salina* en testant différentes concentrations de NaCl (1 M, 1,5 M, 2 M et 3 M) dans le milieu de Johnson. La souche a ensuite été cultivée à 1M pendant 15 jours selon deux phases distinctes : une phase de croissance visant à maximiser la biomasse, suivie d'une phase de stress (salin, lumineux et azoté) afin de stimuler la production de caroténoïdes. Durant toutes les phases le nombre de cellules, le taux de pigments (chlorophylle a et b, et caroténoïdes) ont été évalué. Les taux de protéines, de carbohydrates, de malondialdéhyde et l'activité catalase ont été mesurés en phase de croissance.

Nos résultats montrent qu'une salinité de 1M est adéquate pour une meilleure croissance cellulaire. Dans ces conditions, *D.salina* suit une croissance typique et atteint un nombre de cellule maximale à J15 (8.1×10^4 cellules/mL). La production de pigment chlorophylle a et b étaient maximal à J7 et J10 respectivement. Les taux de protéines, de malondialdéhyde et l'activité catalase les plus élevés ont été observés à J15 alors que le taux de carbohydrate était maximal à J10.

Cependant, lors de la phase de stress, une réduction de la croissance et des pigments chlorophylliens a été notée, tandis que le taux de caroténoïdes a augmenté, suggérant une réponse adaptative des cellules face aux conditions stressantes.

Mots clés : *Dunaliella salina*, Microalgue, croissance, stress, chlorophylle, caroténoïdes.

This study aims to optimize the culture conditions for *Dunaliella salina*, a halotolerant microalga of biotechnological interest, recognized for its capacity to produce high-value biomolecules, such as β -carotene, polyunsaturated fatty acids, and proteins.

Initially, a series of experiments was conducted to determine the optimal salinity for the cultivation of *Dunaliella salina* by testing various NaCl concentrations (1 M, 1.5 M, 2 M, and 3 M) in Johnson's medium. The strain was subsequently cultured at 1 M for 15 days, following two distinct phases: a growth phase intended to maximize biomass, followed by a stress phase (involving saline, light, and nitrogen stress) to stimulate carotenoid production. Throughout all phases, cell count and pigment content (chlorophyll a and b, and carotenoids) were assessed. Protein, carbohydrate, and malondialdehyde (MDA) levels, along with catalase activity, were measured during the growth phase.

Our results demonstrate that a salinity of 1 M is adequate for optimal cell growth. Under these conditions, *D. salina* follows a typical growth pattern, reaching a maximum cell density on day 15 (8.1×10^4 cells/mL). The production of chlorophyll a and b peaked on day 7 and day 10, respectively. The highest levels of proteins, malondialdehyde, and catalase activity were recorded on day 15, whereas the carbohydrate content was maximal on day 10.

However, during the stress phase, a reduction in growth and chlorophyll pigments was observed, while the carotenoid content increased, suggesting an adaptive cellular response to the stressful conditions.

Key Word : *Dunaliella salina*, Microalgae, growth, stress, chlorophyll, carotenoids.

ملخص

يهدف هذا العمل إلى تحسين ظروف زراعة طحلب *دونالديا سالينا* ، وهو طحلب دقيق متحمل للملوحة ذو أهمية في مجال التكنولوجيا الحيوية ، ومعروف بقدرته على إنتاج جزيئات حيوية ذات قيمة مضافة عالية، مثل البيتا كاروتين، والأحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة، والبروتينات

أجريت سلسلة أولى من التجارب لتحديد الملوحة المثلى لنمو *دونالديا سالينا* عبر اختبار تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم (1 مولار، 1.5 مولار، 2 مولار، و 3 مولار) في وسط جونسون لتحقيق ذلك. بعد ذلك، تمت زراعة السلالة في تركيز 1 مولار لمدة 15 يوماً وفقاً لمرحلتين متميزتين: مرحلة نمو تهدف إلى زيادة الكتلة الحيوية إلى أقصى حد، تليها مرحلة إجهاد (ملحي، ضوئي، ونقص النيتروجين) بهدف تحفيز إنتاج الكاروتينات. خلال جميع المراحل، تم تقييم عدد الخلايا ومحتوى الأصباغ (الكلوروفيل أ و ب، والكاروتينات). كما تم قياس مستويات البروتينات، والكربوهيدرات ونشاط إنزيم الكاتالاز خلال مرحلة النمو (MDA) والمالونديالديهيد

تُظهر نتائجنا أن ملوحة 1 مولار هي الأنسب لتحقيق نمو أفضل للخلايا. في هذه الظروف، يتبع طحلب *دونالديا سالينا* نمواً نموذجياً ويصل إلى أقصى عدد للخلايا في اليوم الخامس عشر ($10^4 \times 8.1$ خلية/مل). بلغ إنتاج صبغتي الكلوروفيل أ و ب ذروته في اليوم السابع والعاشر على التوالي. لوحظت أعلى مستويات للبروتينات، والمالونديالديهيد، ونشاط الكاتالاز في اليوم الخامس عشر، بينما كان مستوى الكربوهيدرات في أقصاه في اليوم العاشر

ومع ذلك، خلال مرحلة الإجهاد، لوحظ انخفاض في النمو وفي أصباغ الكلوروفيل، بينما ازداد محتوى الكاروتينات، مما يشير إلى استجابة تكيفية من الخلايا في مواجهة الظروف المجهدة

الكلمات المفتاحية: *دونالديا سالينا*، الطحالب الدقيقة، النمو، الإجهاد، الكلوروفيل، الكاروتينات

Figure	Titre	Page
Figure 1	Photographies de cellules isolées de <i>D.salina</i> . A : Forme verte, B : Forme orange	4
Figure 2	Structure et morphologie de <i>D.salina</i> . A : Forme verte, B : Forme orange.	5
Figure 3	Représentation schématique des différents stades du cycle de vie de l'espèce <i>Dunaliella salina</i> .	6
Figure 4	Exemple de croissance cellulaire de <i>D. salina</i> au cours du temps en batch avec les phases caractéristiques de latence (I), de croissance exponentielle (II) puis linéaire (III), stationnaire (IV) et de déclin (V) .	8
Figure 5	Photographie des flacons de culture contenant <i>Dunaliella salina</i> dans un milieu Johnson à 1M de NaCl.	19
Figure 6	Micromorphologie de <i>Dunaliella salina</i> dans les deux phases : la phase verte en (A, B, C, D,E) et la phase de stress présentés dans les images (F,G,H,I).	21
Figure 7	Cinétique de croissance de la souche <i>D. salina</i> a différentes concentration de NaCl, dans le milieu Johnson pendant 15 jours	21
Figure 8	Evolution des pigments photosynthétiques et de caroténoïdes dans différentes concentration de NaCl 1M, 1.5M, 2M et 3M en milieu Johnson. A : Chlorophylle a, B : Chlorophylle b, C : Caroténoïdes totaux.	23
Figure 9	Cinétique de croissance de la souche <i>D. salina</i> a 1M dans le milieu Johnson phase de croissance (phase verte).	25
Figure 10	Evolution des pigments photosynthétique en fonction du temps en phase de croissance en milieu Johnson à 1M	27
Figure 11	Evolution de la concentration des protéines en fonction des jours en phase de croissance en milieu Johnson à 1M	28
Figure 12	Concentration du Malondialdéhyde (MDA) en phase de croissance dans le milieu Jonhson à 1M.	29
Figure 13	Activité catalase en phase de croissance en phase de croissance dans le milieu Jonhson à 1M.	30
Figure 14	Concentration des carbohydrates en fonction des jours de culture en phase de croissance en milieu Johnson à 1M	31
Figure 15	Cinétique de croissance de la souche <i>D. salina</i> dans un stress salin, sans nitrate et de lumière dans le milieu Johnson phase de stress (phase orange).	32
Figure 16	Evolution des pigments photosynthétiques et des caroténoïdes totaux de la souche <i>D. salina</i> dans un stress salin, sans nitrate et de lumière dans le milieu Johnson en phase de stress (phase orange).	34

TABLE DES MATIERES

Remerciements

Résumé

Abstract

ملخص

Tableaux des figures

INTRODUCTION GENERALE.....1

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. *Dunaliella Salina*.....3

I.1. Historique sur *Dunaliella Salina*.....3

I.2. Définition de *Dunaliella Salina*.....3

I.3. Taxonomie de *Dunaliella salina*.....4

I.4. Morphologie et structure de *Dunaliella salina*.....4

I.5. Reproduction et cycle de vie de *Dunaliella salina*.....5

I.5.1. Reproduction asexuée (végétative).....5

I.5.2. Reproduction sexuée.....5

I.6. Modes et systèmes de culture de *Dunaliella salina*.....6

I.6.1. Modes de fonctionnement de la culture.....7

I.6.1.1. *Mode discontinu* (en batch).....7

I.6.1.2. *Mode de culture en semi-continu ou « fed-batch »*.....8

I.6.1.3. *Mode de culture continu*.....8

I.7. Physiologie et besoins fondamentaux du *D.salina*.....9

I.7.1. Facteurs écophysologiques influençant la croissance.....9

I.7.2. Besoin nutritionnels de *D.salina*.....10

I.8. Biomolécules d'intérêts produites par *Dunaliella salina*.....10

I.8.1. Caroténoïdes.....11

I.8.2. Protéines, acides aminés et antioxydants.....11

I.8.3. Lipides et acides gras polyinsaturés.....11

CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

II. Matériel et méthodes.....12

II.1.1. Matériel biologique.....12

II.1.2. Matériels non biologique12

II.2. Méthodes.....	12
II.2.1. Optimisation des conditions de culture de <i>D.salina</i>.....	12
II.2.1.1. Choix des conditions de culture <i>D.salina</i> en milieu johnson liquide.....	13
II.2.1.2. Culture de <i>D.salina</i>.....	13
II.2.2. Etude morphologique de <i>Dunaliella salina</i>.....	15
II.2.3. Préparation de la biomasse et évaluation de nombre de cellule de <i>Dunaliella salina</i>	15
II.2.4. Evolution des pigments durant la croissance.....	16
II.2.5. Dosage des carbohydrates.....	16
II.2.6. Dosage des protéines par la méthode de Bradford.....	17
II.2.7. Dosage du taux Malondialdéhyde (MDA).....	17
II.2.8. Dosage de l'activité catalase.....	18
II.3. Etude statistique.....	18

CHAPITRE III : RESULTATS ET DICUTION

III. Résultats et Discussion	19
III.1. Caractéristique morphologique de <i>Dunaliella salina</i>.....	19
III.1.1. Aspect macroscopique de la culture de <i>Dunaliella salina</i>	19
III.1.2. Micromorphologies.....	20
III.2. Résultats du choix de salinité optimale pour la croissance.....	23
III.3. Evolution des pigments dans différentes salinités.....	23
III.4. Résultats de la phase de croissance de <i>D.salina</i>.....	25
III.4.1. Croissance de la souche <i>D.salina</i> phase de croissance	25
III.4.2. Production de pigments en phase de croissance.....	26
III.4.3. Résultats du dosage des protéines en phase de croissance.....	28
III.4.4. Résultats du dosage d Malondialdéhyde en phase de croissance	29
III.4.5. Résultats du dosage de la catalase en phase de croissance.....	30
III.4.6. Résultats de dosages de carbohydrates phase de croissance	31

III.5. Résultats de la phase de stress salin, de lumière et de carence en azote de <i>D.salina</i>	32
---	-----------

Conclusion et perspectives	36
---	-----------

Références Bibliographiques

Annexes

Introduction

Les microalgues sont des microorganismes unicellulaires, majoritairement photosynthétiques, capables de coloniser une grande diversité d'écosystèmes, des milieux hypersalés aux environnements dulçaquicoles et terrestres (Oren, 2023). Elles constituent un réservoir de métabolites bioactifs encore largement inexploité, ouvrant la voie à de nombreuses applications biotechnologiques (Santos et al., 2023 ; Gouveia et al., 2024).

Ces dernières décennies, l'intérêt scientifique et industriel pour les microalgues s'est intensifié en raison de leur potentiel en production durable de composés d'intérêt : lipides, pigments, antioxydants, biocarburants, compléments alimentaires, molécules pharmaceutiques et cosmétiques (Shah et al., 2018 ; Jacob-Lopes et al., 2019). Toutefois, sur les quelque **30 000 espèces connues**, seules quelques centaines ont été étudiées en détail, et moins d'une vingtaine sont exploitées à l'échelle industrielle (Laurens et Lane, 2021).

Parmi elles, *Dunaliella salina* se distingue par sa tolérance extrême au sel, sa richesse en β -carotène et sa plasticité physiologique. Cette algue verte biflagellée de la classe des Chlorophycées se développe dans des milieux hypersalés et est souvent responsable de la coloration rose-rouge caractéristique des mares salines (Oren, 2005 ; Harvey et Ben-Amotz, 2020).

La production de β -carotène, pouvant atteindre jusqu'à 14 % de sa biomasse sèche, est fortement induite par des conditions environnementales stressantes (salinité élevée, forte lumière, carences nutritives). Ce pigment naturel est recherché pour ses propriétés antioxydantes, son rôle en tant que provitamine A, et son usage comme colorant naturel dans les industries alimentaire et cosmétique (Gómez et González, 2005 ; Gouveia et al., 2024).

En Algérie, bien que les recherches sur *D. salina* restent encore limitées, les nombreux sites hypersalins (chotts, sebkhas) offrent un potentiel écologique et biotechnologique important. Ces environnements constituent un terrain propice à l'isolement de souches locales adaptées aux conditions extrêmes, avec des perspectives prometteuses pour des projets de valorisation industrielle durable à l'échelle nationale.

Dans ce contexte, cette étude s'inscrit dans une démarche visant à optimiser les conditions de culture de *Dunaliella salina* afin de favoriser sa croissance cellulaire et maximiser la production de biomolécules d'intérêt (notamment le β -carotène, les protéines et les acides gras). L'objectif est de déterminer les paramètres physico-chimiques les plus favorables à son développement en conditions contrôlées. Une telle optimisation permettrait non seulement d'accroître la productivité de la biomasse en laboratoire, mais également de fournir des données techniques utiles pour une potentielle valorisation industrielle de cette souche,

notamment dans un contexte local tel que celui de l'Algérie, riche en milieux hypersalins naturels.

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Dunaliella Salina

I.1. Historique sur *Dunaliella Salina*

La découverte de *Dunaliella salina* date du XIXe siècle lorsqu'en 1838, Michel Félix Dunal un botaniste français a remarqué l'existence d'une microalgue responsable d'un pigment rouge des mares salines en France (montPELLIER) et qu'il a nommé *Haematococcus salinus*. En 1905, cette microalgue était identifiée en tant que nouveau genre « *Dunaliella* » et classé sous le nom « *Dunaliella salina* » comme espèce-type par le botaniste roumain Emanoil C. Teodoresco (Oren, 2005).

I.2. Définition de *Dunaliella Salina*

Dunaliella salina est une microalgue verte unicellulaire, mobile grâce à deux flagelles, appartenant au genre *Dunaliella* (30 espèces identifiées). Elle se caractérise par sa forte tolérance au stress osmotique et sa capacité à produire de grandes quantités de bêta-carotène, un pigment antioxydant, en réponse à des conditions environnementales extrêmes telles qu'une forte salinité, une intense lumière ou des carences en nutriments (Figure 1) (González et al., 2024).

Dunaliella salina est la plus étudiée de toutes les espèces du genre *Dunaliella*. Il s'agit d'une espèce de microalgue marine unicellulaire appartenant à la classe des Chlorophycées (lignée verte) (Oren, 2005 ; González et al., 2024), qui se développe spontanément dans les milieux lagunaires très salés (les marais salants, les lagunes salées et les bassins d'eau salée près de la mer).

Elle est bi-flagellée, sa taille peut varier de 16 à 24 µm en longueur et entre 10 à 15 µm de largeur (Cadoret et Bernard, 2008), elle produit une couleur distincte rose et rouge souvent caractéristique des mares salines (Figure 1) (Oren et Rodriguez, 2001 ; González et al., 2024).

D.salina est l'un des organismes eucaryote photosynthétiques les plus tolérants aux conditions environnementales extrêmes (Mishra et al., 2008). En tant qu'espèce halophile elle peut tolérer des salinités allant jusqu'à 292 g.L⁻¹ (Fisher et al., 1996), ce qui lui confère un avantage sur ses compétiteurs et prédateurs, la rendant ainsi dominante (Apel et Weuster-Botz, 2015).

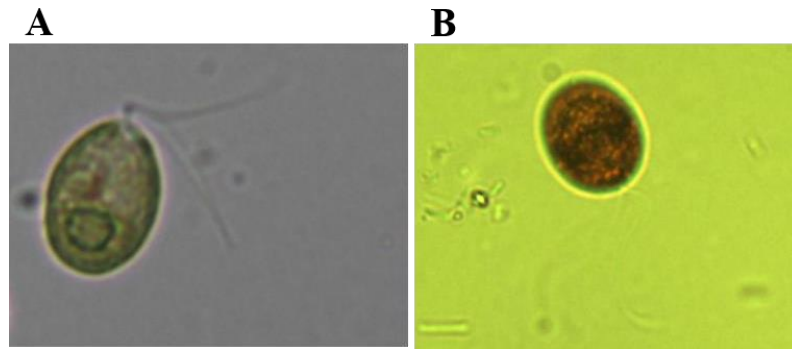


Figure 1. Photographies de cellules isolées de *D.salina* . A : Forme verte, B : Forme orange (Besson, 2013).

I.3. Taxonomie de *Dunaliella salina*

En se basant sur des critères morphologique, physiologiques et génétiques, la taxonomie de *Dunaliella salina* fut proposée pour la première par Teodoresco qui la classer comme une espèce du domaine *Eukaryota*, qui appartient au règne des *Plantae*, du phylum *Chlorophyta*, de la classe *Chlorophyceae*, de l'ordre *Chlamydomonadales* (=Volvocales), de la famille *Dunaliellaceae* et du genre *Dunaliella* (Gonzalez et al., 2009 ; Assunção, et al., 2018).

I.4. Morphologie et structure de *Dunaliella salina*

Dunaliella salina est une microalgue unicellulaire halophile de forme ovoïde à sphérique, dotée de deux flagelles isocontes (de longueur égale) qui assurent sa mobilité active. Les dimensions moyennes de la cellule varient entre 9 et 14 μm de longueur et 6 à 10 μm de largeur, selon les conditions de culture (Assunção et al., 2018 ; Rani et al., 2023). Contrairement à de nombreuses algues vertes, *D. salina* ne possède pas de paroi cellulaire rigide, mais est entourée d'une membrane plasmique fine, élastique et mucilagineuse de nature glycoprotéique, appelée glycocalyx, qui joue un rôle important dans l'adaptation osmotique (Figure 2) (Zhu et al., 2022 ; Zuo et al., 2024).

Le chloroplaste est de forme cupuliforme et renferme un pyrénnoïde central bien développé, autour duquel s'accumulent des granules d'amidon visibles en microscopie électronique (González et al., 2024). Sous stress (lumière intense, forte salinité), la cellule accumule du β -carotène, ce qui lui donne une coloration rouge-orangée au lieu de verte (Fagundes et al., 2023). Ce pigment est stocké dans des plastoglobules situés à la périphérie du chloroplaste, associés aux thylakoïdes (Van Wijk et Kessler, 2017). Ces structures participent à la régulation des caroténoïdes en réponse au stress (Figure 2).

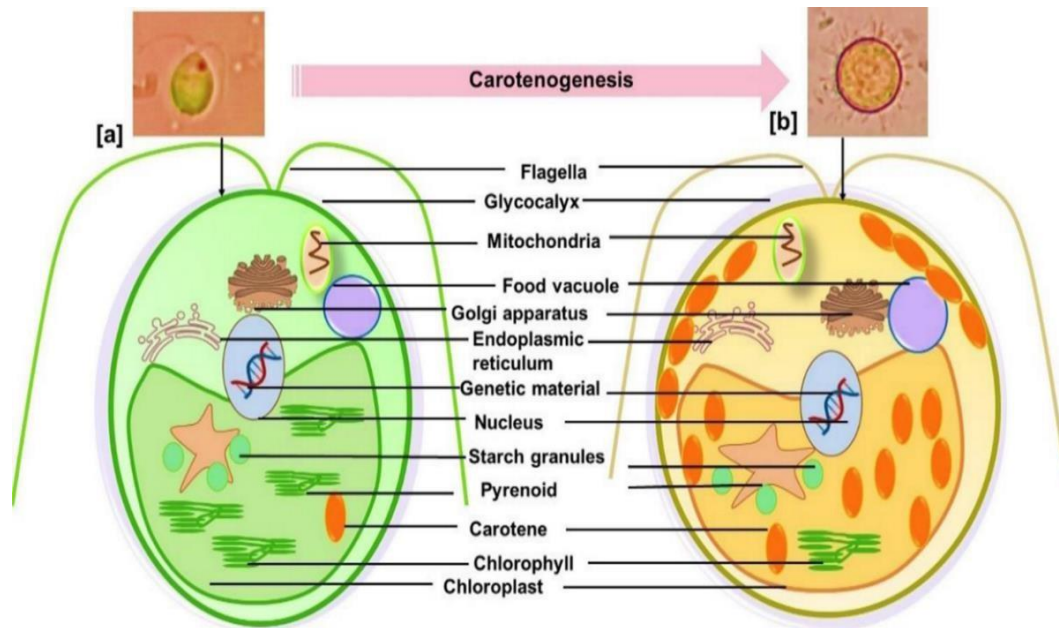


Figure 2. Structure et morphologie de *D. salina*. A : Forme verte, B : Forme orange (Besson, 2013).

I.5. Reproduction et cycle de vie de *Dunaliella salina*

Dunaliella salina est une microalgue halophile unicellulaire qui présente un cycle de vie complexe, alternant entre reproduction asexuée et sexuée, influencé par les conditions environnementales.

I.5.1. Reproduction asexuée (végétative)

En conditions environnementales stables (surtout à salinité optimale), *D. salina* se reproduit essentiellement de manière asexuée par mitose longitudinale. Une cellule mère se divise symétriquement pour donner deux cellules filles génétiquement identiques, chacune héritant du matériel génétique et de deux flagelles. Ce mode de reproduction rapide permet une croissance exponentielle de la population, notamment lors de phases de forte disponibilité en lumière et en nutriments (Borowitzka et Moheimani., 2023). Les cellules ne forment ni spores ni kystes à ce stade.

I.5.2. Reproduction sexuée

La reproduction sexuée est beaucoup plus rare et se déclenche en réponse à des stress environnementaux sévères, comme un changement brusque de salinité, une carence nutritive ou une variation extrême de température (Polle et Ben-Amotz., 2021).

Le cycle sexué suit plusieurs étapes (Zhang et al., 2022):

- **Formation des gamètes** : certaines cellules végétatives se transforment en gamètes isogames (morphologiquement identiques), généralement flagellés, et libèrent des substances chimiques (phéromones) favorisant la reconnaissance mutuelle.
- **Fusion des gamètes** (syngamie) : deux gamètes s'attirent chimiquement, fusionnent par les flagelles, puis par les corps cellulaires, formant un zygote diploïde.
- **Formation d'un kyste (zygospore)** : le zygote entre en dormance sous forme de kyste, souvent à paroi épaisse et riche en caroténoïdes (rougeâtre), ce qui le protège des conditions défavorables.
- **Germination** : à l'amélioration des conditions, la méiose se produit et donne naissance à de nouvelles cellules haploïdes capables de reprendre le cycle végétatif.

Cette reproduction sexuée permet le brassage génétique, essentiel à l'adaptation évolutive de l'espèce à des environnements fluctuants (Zhang *et al.*, 2022).

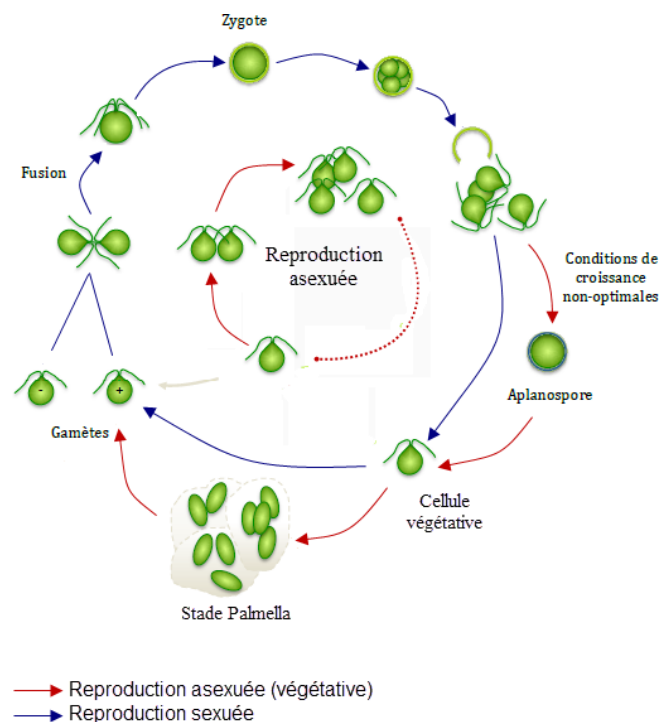


Figure 3. Représentation schématisée des différents stades du cycle de vie de l'espèce *Dunaliella salina* (Le Chevantan, 2013).

I.6. Modes et systèmes de culture de *Dunaliella salina*

La production de *Dunaliella salina* est en forte augmentation. C'est la troisième microalgue la plus produite au monde derrière *Arthrospira platensis* (Spiruline) (Dibenedetto, 2011).

Dunaliella salina est l'une des microalgues les plus étudiées et cultivée pour sa croissance rapide et ses capacités exceptionnelles d'accumulation de β -carotène, un antioxydant naturel à

haute valeur ajoutée utilisé en cosmétique, en nutrition et en pharmacie. En conditions de stress (forte salinité, lumière intense, carence azotée), elle peut accumuler jusqu'à 10 à 14% de son poids sec en caroténoïdes (Mobin et Alam, 2017 ; Borowitzka, 2023).

Elle est également une source potentielle de glycérol, utilisé comme cryoprotéctant, et de protéines, pigments, acides gras essentiels, ce qui la rend intéressante pour l'aquaculture et les industries agroalimentaires (Xu et al., 2024).

D'après les estimations de 2023 la production annuelle de *Dunaliella salina* était estimée aux alentours de 1200 tonnes (Sakhawat et al., 2023).

Divers systèmes et modes de culture sont aujourd'hui utilisés pour produire *Dunaliella salina* principalement les modes : en batch (discontinu), semi continu et en continu. Ces modes de culture se différencient exclusivement par la régulation des apports en nutriments réalisés (Jauzein, 2009).

Dunaliella salina peut être cultivée dans des systèmes ouverts (bassins raceways, lagunes) ou fermés (photobioréacteurs). Les systèmes ouverts sont économiques et simples à mettre en œuvre, mais exposés à un risque élevé de contamination, à des pertes de CO₂ et à une évaporation importante (Borowitzka, 1999 ; Louw et al., 2016). À l'inverse, les systèmes fermés permettent un meilleur contrôle des conditions de culture (température, pH, lumière) et favorisent des rendements élevés, atteignant jusqu'à 27 kg·m⁻³ (Masojídek et al., 2015 ; Huang et al., 2017). Toutefois, leur coût élevé et leur complexité technique limitent leur utilisation à des productions à valeur ajoutée ou à la recherche (Deprá et al., 2019).

I.6.1. Modes de fonctionnement de la culture

1. Mode discontinu (en batch)

La culture en mode batch est l'une des méthodes les plus utilisées pour les microalgues, en raison de sa simplicité et de son faible coût en matériel et maintenance (Le Chevanton, 2013). Dans ce système fermé, l'inoculum et les nutriments sont ajoutés en une seule fois au début, sans renouvellement du milieu ni échange avec l'extérieur pendant toute la durée de la culture. La croissance cellulaire se poursuit jusqu'à épuisement d'un nutriment essentiel, entraînant un ralentissement puis un arrêt de la prolifération (Cantin, 2010).

Ce mode est adapté aux cultures axéniques ou expérimentales, mais présente certaines limites pour les applications à long terme : au fil du temps, la concentration cellulaire augmente, ce qui modifie l'accès à la lumière, la composition du milieu et la biochimie des cellules. La croissance se déroule selon une courbe sigmoïde, comprenant cinq phases caractéristiques, avec

une phase exponentielle où la croissance est maximale (Salomez, 2009). Cinq phases principales (Figure 4) (Le Chevanton, 2013) :

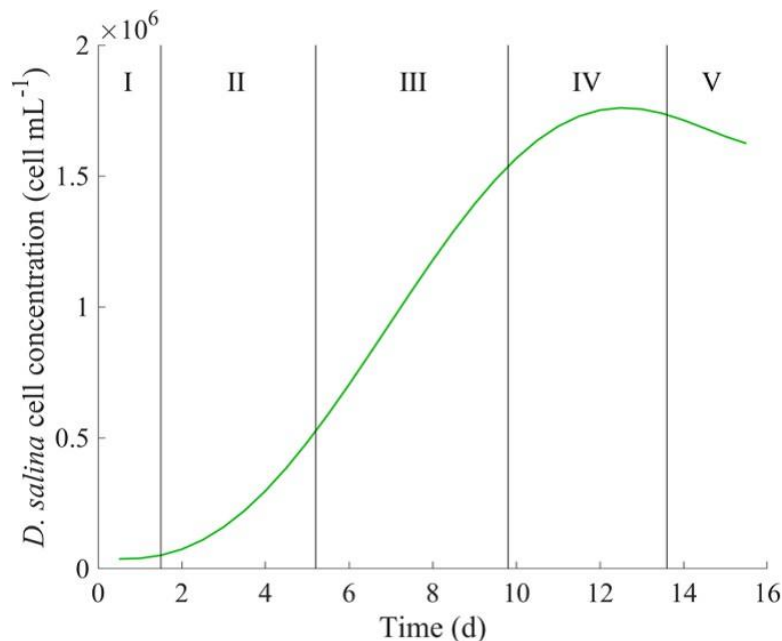


Figure 4. Exemple de croissance cellulaire de *D. salina* au cours du temps en batch avec les phases caractéristiques de latence (I), de croissance exponentielle (II) puis linéaire (III), stationnaire (IV) et de déclin (V) (Le Chevanton, 2013).

- Phase de latence (I) : au cours de cette phase qui dure de quelques heures à plusieurs dizaines d'heures, le taux de croissance est très faible (.
- Phase d'accélération (II) : les cellules commencent à se multiplier jusqu'à atteindre leur taux de croissance maximal.
- Phase de croissance exponentielle (III) : la croissance est exponentielle et est maintenue constante jusqu'à ce que la composition du milieu ne soit plus optimale.
- Phase stationnaire (IV) : un des éléments du milieu (lumière, azote, phosphore, carbone,...) devient limitant, et en conséquence la vitesse de croissance diminue, les quantités de cellules qui se divisent et qui meurent sont égales, ce qui produit un plateau de croissance. Les lipides et les glucides peuvent continuer à s'accumuler dans cette phase.
- Phase de décroissance (V) : la plupart des cellules ont épuisé leurs réserves intracellulaires de composants et elles n'ont plus suffisamment d'énergie à leur disposition pour poursuivre la maintenance cellulaire et meurent.

2. *Mode de culture en semi-continu ou « fed-batch »*

Le mode de culture fed-batch est une stratégie de culture semi-continue, se distingue du précédent par l'introduction progressive du milieu de culture dans un photobioréacteur qui est partiellement rempli au départ, cet ajout intervient à un instant donné pendant sa phase transitoire ou la phase exponentielle de la culture, jusqu'à atteindre un volume final souhaité. Ce mode de fonctionnement se caractérise par un volume de culture variable. Le mode fed-batch permet d'optimiser la productivité de biomasse et d'éviter les effets de limitation des substrats (Tebhani et al., 2014 ; Monaco et Prouzet.,2014).

3. *Mode de culture continu*

Ce mode repose sur l'introduction d'un flux continu de nutriments dans un système de culture à volume constant contenant des microalgues. Ainsi l'apport en milieu nutritif génère un flux de sortie équivalent, correspondant à la biomasse algale produite (Melanie, 2009), La culture est débutée en mode batch jusqu'à ce que la concentration cellulaire souhaitée soit obtenue puis le milieu de culture est injecté en continu (Cantin, 2010). Ce mode est l'idéal à atteindre, car il permet d'avoir des paramètres stables, d'optimiser la production dans le temps en minimisant les arrêts de production. De plus moins de mains d'œuvre est nécessaire ce qui réduit considérablement les couts de production (Salomez, 2009).

I.7. Physiologie et besoins fondamentaux du *D.salina*

I.7.1. Facteurs écophysologiques influençant la croissance

La croissance de *Dunaliella salina* dépend de plusieurs facteurs physiques et chimiques tels que la salinité, la température, la lumière et le pH, chacun ayant des valeurs optimales spécifiques. Bien que ces paramètres varient selon les souches, *D. salina* présente une valence écologique très large, ce qui lui permet de tolérer des conditions environnementales extrêmes (Barros et al., 2022 ; Oren, 2023).

- Salinité : *D. salina* est une microalgue euryhaline, capable de croître dans des milieux salés allant jusqu'à la saturation (~35 %) grâce à des mécanismes osmoprotecteurs. Toutefois, la salinité optimale pour la croissance est généralement située entre 5 % et 15 %, selon les souches (Li et al., 2023).
- Température : La température optimale varie de 20 à 35°C, avec une croissance maximale souvent observée autour de 30°C. Des températures >40°C deviennent

inhibitrices, surtout à faible salinité. Il existe donc une interaction forte entre température et salinité (**Gouveia et al., 2024**).

- Lumière : En tant qu'organisme photosynthétique, *D. salina* tolère une large gamme d'éclaircements (50 à 1500 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), avec une croissance optimale autour de 800 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Un excès de lumière peut toutefois induire une photoinhibition réduisant l'efficacité photosynthétique (**Santos et al., 2023**).
- pH : L'algue peut se développer dans une gamme de pH allant de 5,5 à 10, avec un optimum autour de 7,5 à 8. Des écarts extrêmes peuvent perturber l'absorption des nutriments et la fixation du carbone (**Besson, 2013 ; Barros et al., 2022**).

I.7.2. Besoin nutritionnels de *D.salina*

D. salina est une microalgue photo-autotrophe stricte, qui puise son énergie dans la lumière et utilise le carbone inorganique (CO_2) comme source principale. En raison de la faible solubilité du CO_2 dans l'eau salée, un apport externe sous forme de bullage de CO_2 est souvent nécessaire, accompagné d'une régulation du pH pour maintenir la disponibilité du carbone assimilable (**Besson, 2013 ; Gouveia et al., 2024**).

Elle nécessite également des macronutriments essentiels comme l'azote (N), le phosphore (P) et, parfois, la silice (Si), ainsi que des oligo-éléments (Fe, Mg, Zn, Mn) indispensables à la biosynthèse de protéines, d'enzymes et au bon fonctionnement de la photosynthèse (**Wang et al., 2008**).

Fait remarquable, *D. salina* est une espèce vitamines-indépendante : elle n'a pas besoin d'apports externes en cobalamine (B12), thiamine (B1) ou biotine (B7), contrairement à d'autres microalgues. Elle possède à cet effet des voies métaboliques alternatives permettant la synthèse autonome de ces cofacteurs (**Croft et al., 2005**).

I.8. Biomolécules d'intérêts produites par *Dunaliella salina*

Dunaliella salina est une microalgue halophile reconnue pour sa capacité à produire une variété de métabolites bioactifs à haute valeur ajoutée, en particulier en réponse à des stress environnementaux (lumière, salinité, carence nutritive). Elle constitue ainsi une source précieuse de caroténoïdes, protéines, acides gras polyinsaturés, acides aminés et antioxydants (**Gouveia et al., 2024 ; Santos et al., 2023**).

I.8.1. Caroténoïdes

D. salina est principalement exploitée pour sa production élevée de β -carotène, un pigment liposoluble pouvant représenter jusqu'à 13–14 % de son poids sec en conditions de stress (Gouveia et al., 2024). Ce caroténoïde, précurseur de la vitamine A, s'accumule dans des gouttelettes lipidiques au niveau des chloroplastes en réponse à un excès de lumière, à une forte salinité ou à une carence en azote (Barros et al., 2022).

Le β -carotène agit comme photo-protecteur, protégeant la chlorophylle et l'ADN contre les dommages oxydatifs. Il est également valorisé en cosmétologie, nutrition et santé humaine pour ses propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires (Cardozo et al., 2007 ; Safi et al., 2014).

II.8.2. Protéines, acides aminés et antioxydants

En conditions optimales, *D. salina* peut contenir jusqu'à 50 à 60 % de protéines sur matière sèche. Cette production est modulée par la salinité et les conditions nutritionnelles, notamment l'azote. Une forte salinité peut initialement réduire la synthèse protéique, mais certaines souches s'adaptent en exprimant des protéines de stress spécifiques (BenMoussa-Dahmen et al., 2020).

L'algue synthétise également plusieurs acides aminés essentiels (alanine, arginine, etc.), dont la production peut être stimulée par des carences azotées, et qui servent de précurseurs pour la biosynthèse de molécules antioxydantes telles que le glutathion et certains flavonoïdes (Nehmé et al., 2017).

II.8.3. Lipides et acides gras polyinsaturés

Bien que non considérée comme une espèce oléagineuse majeure, *D. salina* peut accumuler des lipides à hauteur de 6 à 10 % du poids sec en conditions de stress, principalement sous forme de triglycérides et d'acides gras polyinsaturés (AGPI), notamment les oméga-3 et oméga-6 (Santos et al., 2023).

Ces lipides sont valorisés dans l'agroalimentaire, la nutrition animale et la formulation de compléments alimentaires. En outre, la forte accumulation de triglycérides sous stress lumineux ouvre des perspectives pour la production de biodiesel à partir de cette microalgue (Besson, 2013 ; Rabbani et al., 1998).

Chapitre II : Matériel et Méthodes

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire de mycologie du département de biotechnologie et agro-écologie de l'université de Blida 1, durant une période de 2 mois allant du 27 avril au 25 juin. Elle s'inscrit dans le cadre d'un travail de recherche visant à optimiser les conditions de culture de *Dunaliella salina*, une microalgue halophile connue pour sa capacité à produire des caroténoïdes en conditions extrêmes. Les principaux objectifs de l'étude sont les suivants:

- Optimiser la concentration en NaCl dans le milieu de culture, afin d'identifier la salinité optimale pour la croissance de *D. salina*.
- Déterminer les conditions de culture favorables à une production maximale de biomasse, en évaluant les différentes phases de croissance.
- Étudier la production de caroténoïdes sous l'effet de stress tels que : une salinité élevée, une intensité lumineuse accrue, et une carence en nitrate.

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel biologique

Dans cette étude nous avons utilisé la microalgue *Dunaliella salina*, souche d'origine espagnole, fournis par le professeur Doumandji, conservée dans des conditions stériles.

II.1.2. Matériels non biologique

Les appareillages, le milieu de culture, et les réactifs utilisés dans cette étude sont résumés dans l'annexe 1.

II.2. Méthodes

II.2.1. Optimisation des conditions de culture de *D.salina*

Nous avons utilisé le milieu Johnson comme milieu nutritif, qui est spécifique au genre *Dunaliella*. Le milieu a été préparé selon la formulation standard et stérilisé à l'autoclave à 120 °C pendant 20 minutes avant inoculation. La composition chimique de ce milieu est indiquée dans le tableau 1 (**Borowitzka, 1988**) (**Annexe 2**).

Afin de garantir des conditions de culture contrôlées et stériles, une chambre de culture a été construite à l'aide de plaques de polystyrène, formant un espace fermé et obscur. Cette structure permettait à la fois l'isolation des cultures pour limiter les risques de contamination et une gestion optimale de la lumière.

L'intérieur de la chambre a été équipé de trois lampes LED fluorescentes blanches froides, délivrant une intensité lumineuse de $120 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, selon un cycle photopériodique de 12 heures de lumière suivies de 12 heures d'obscurité. La température d'incubation à l'intérieur de la chambre était maintenue à $22 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ (environ $25 \text{ }^\circ\text{C}$).

L'agitation et l'oxygénation des cultures ont été assurées par une pompe à air, délivrant un barbotage constant à travers des tubes en silicone stérile, avec un air préalablement filtré avec un filtre de $0.2\mu\text{m}$. Le système de barbotage a été activé quotidiennement afin de maintenir des conditions homogènes au sein des milieux de culture.

II.2.1.1. Choix des conditions de culture *D.salina* en milieu johnson liquide

Dans le but de déterminer la salinité optimale permettant d'obtenir la biomasse maximale, *Dunaliella salina* a été cultivée pendant 15 jours sur milieu Johnson, préparé avec différentes concentrations de NaCl : 1 M, 1.5M, 2 M et 3 M. Chaque culture a été réalisée dans un volume final de 150 mL de milieu,ensemencé avec 10 % (v/v) d'inoculum.

Les cultures ont été incubées dans des conditions contrôlées de température ($22 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$), de pH (compris entre 7,5 et 8), et d'intensité lumineuse ($120 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) avec un cycle de photopériode de 12h/12h lumière/obscurité. Un système de barbotage d'air a été utilisé pour assurer l'agitation et l'oxygénation des milieux de culture.

L'évaluation de la biomasse produite a révélé que la concentration de 1 M en NaCl permettait d'obtenir la meilleure croissance. Par conséquent, cette concentration a été retenue pour les étapes expérimentales ultérieures.

II.2.1.2. Culture de *D.salina*

La culture de *Dunaliella salina* a été réalisée sur une période d'un mois, subdivisée en deux phases : une phase de croissance (verte) de 15 jours, suivie d'une phase de stress (caroténogénèse) de 15 jours.

1. Phase de croissance

Un inoculum de *Dunaliella salina* a été cultivé dans des flacons en verre de 500 mL, contenant chacun 150 mL de milieu Johnson stérile (4 flacons). L'inoculation a été réalisée à 10 % (v/v) à partir d'une culture mère active. Ces cultures d'inoculum ont été incubées dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment : température de $22 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$, pH entre

7,5 et 8, intensité lumineuse de $120 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ selon un cycle photopériodique de 12 h lumière/12 h obscurité, et barbotage d'air filtré pour assurer l'aération et l'agitation.

La croissance de *Dunaliella salina* a été suivie quotidiennement en mesurant la densité optique (DO) à 660 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Cette longueur d'onde a été choisie car elle permet d'estimer la biomasse en suspension tout en minimisant l'interférence des pigments photosynthétiques. Des observations microscopiques ont été effectuées pour examiner la morphologie cellulaire, ainsi que pour surveiller d'éventuelles contaminations. Parallèlement, des dosages des pigments photosynthétiques (chlorophylle a, chlorophylle b et caroténoïdes totaux) ont été entrepris.

Des prélèvements de 10 mL ont été effectués tous les trois jours aux jours J3, J7, J9, J11 et J15. Ces échantillons ont servi à la préparation de biomasse pour le dosage des glucides totaux, ainsi qu'à la quantification des protéines et à l'évaluation de certains marqueurs de stress oxydatif, notamment le malondialdéhyde (MDA), indicateur de la peroxydation lipidique, et l'activité de la catalase, enzyme antioxydante.

À la fin de la culture (J15), la biomasse résiduelle a été utilisée pour une phase de stress visant à induire la caroténogénèse, afin d'étudier la capacité de *D. salina* à produire des caroténoïdes en conditions défavorables.

2. Phase de stress « Test de caroténogénèse »

Le test de caroténogénèse repose sur la capacité de *Dunaliella salina* à synthétiser et accumuler des caroténoïdes, en particulier le β -carotène, en réponse à des conditions de stress. En phase de stress, la cellule active des mécanismes de protection, notamment contre le stress oxydatif, en augmentant la production de pigments antioxydants (Liu et al., 2016).

Pour induire ce processus, la biomasse cultivée en conditions optimales est transférée dans un nouveau milieu ou soumise à des conditions défavorables, telles qu'une forte salinité, une intensité lumineuse élevée, une carence en azote ou un pH extrême. Ces conditions déclenchent une réponse adaptative qui se traduit par une accumulation intracellulaire de caroténoïdes, visibles par le changement de coloration des cellules (teinte orangée à rougeâtre) (Liu et al., 2016).

La teneur en caroténoïdes est ensuite quantifiée par extraction dans un solvant organique (souvent acétone ou méthanol) suivie d'une lecture spectrophotométrique à une longueur

d'onde spécifique (souvent 470-480 nm), permettant d'évaluer l'induction de la caroténogenèse (Liu et al., 2016).

Après 15 jours de culture, le volume de la phase verte est centrifugé à 5000 rpm pendant 15 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est transféré dans 150 ml de milieu Johnson sans nitrate, préparé avec différentes concentrations de NaCl : 1 M, 2 M, 3 M et 4 M.

Les cultures sont incubées à une température de 22 ± 3 °C et un pH du milieu ajusté entre 7,5 et 8. Une forte intensité lumineuse de $240 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ avec un cycle de 12h/12h (lumière/obscurité). Ces cultures sont aérées et agitées par barbotage et suivies quotidiennement.

La croissance de *Dunaliella salina* a été suivie en mesurant la densité optique (DO) à 660 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Des observations microscopiques ont été effectuées pour examiner la morphologie cellulaire, ainsi que pour surveiller d'éventuelles contaminations. Parallèlement, des dosages des pigments photosynthétiques (chlorophylle a, chlorophylle b et caroténoïdes totaux) ont été entrepris.

II.2.2. Etude morphologique de *Dunaliella salina*

L'observation microscopique de *D.salina* a été réalisée à l'aide d'un microscope optique à caméra intégrée modèle B-150 OPTIKA, Italie.

Dans des eppendorfs stériles, 1mL de chaque culture est transféré aseptiquement. Les cultures sont observées entre lame et lamelle à l'état frais ou après fixation des cellules en ajoutant une goutte de formol à 4 % pour immobiliser les cellules. Les lames sont observées à différents grossissements afin de déterminer la forme, le nombre des cellules, la présence ou l'absence de paroi et de stigma et la production ou non de pigments caroténoïdes.

L'identification morphologique de la souche a été faite en se référant aux travaux de Oren, (2005) et Borowitzka et Siva (2007).

II.2.3. Préparation de la biomasse et évaluation de nombre de cellule de *Dunaliella salina*

La concentration cellulaire de *Dunaliella salina* a été estimée en mesurant quotidiennement la densité optique (DO) à 660 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Une

courbe d'étalonnage a été préalablement établie en corrélant les valeurs de DO à 660 nm avec des comptages cellulaires directs sur cellule malassez, permettant ainsi de convertir les mesures d'absorbance en nombre de cellules par millilitre (Zhu *et al.*, 2018).

La biomasse a été préparée en prélevant un volume de 10 mL de chaque culture dans des tubes et les centrifugé à 5000 rpm pendant 15 min. Le culot cellulaire est lavé deux fois à l'aide de l'eau distillé afin d'éliminer les impuretés et les résidus du milieu, suivi d'une autre centrifugation à 5000 rpm pendant 15 min. La biomasse est ensuite séchée à l'étuve à 105 °C pendant une heure pour le dosage des glucides totaux et conservée à -20 °C pour les autres dosages (Protéines, MDA, et catalase) (Al Mahanna *et al.*, 2023).

II.2.4. Evolution des pigments durant la croissance

Les pigments photosynthétiques (chlorophylles a et b) ont été dosés afin d'estimer la croissance cellulaire. Les pigments caroténoïdes totaux ont également été estimés. La méthode utilisé est celle de Wellburn (1994) qui consiste en une extraction par du méthanol à 100% comme solvant. Un volume de 1 mL de la culture est introduit dans un tube Eppendorf qui est centrifugé à une vitesse de 3000 rpm pendant 15 min, permettant ainsi la séparation parfaite de la biomasse du milieu de culture. Le surnageant est éliminé, puis 1 mL de méthanol est ajouté. Après homogénéisation à l'aide d'un vortex, le mélange est maintenu à l'obscurité à 4°C afin d'éviter la dégradation des pigments. A la fin de l'extraction, une deuxième centrifugation est réalisée. L'absorbance est lue à trois longueurs d'ondes, 470, 653 et 666 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (Wellburn, 1994). Les formules appliquées pour le calcul des concentrations des pigments sont celle de Wellburn (1994) :

- Chl a= $15,65 \times (A_{666}) - 7,34 \times (A_{653})$
- Chl b= $27,05 \times (A_{653}) - 11,21 \times (A_{666})$
- PCT= $(1000 \times A_{470} - 2,86 \times \text{Chl a} - 129,2 \times \text{Chl b})/221$

PCT: Pigments caroténoïdes totaux. Les résultats sont exprimés en µg/mL.

II.2.5. Dosage des carbohydrates

Une quantité de 10 mg de biomasse sèche est transférée dans un tube Eppendorf contenant 1 ml (2,5 N) d'acide chlorhydrique (HCl). Le mélange est ensuite centrifugé à 10 000 g pendant 10 minutes. 500 µL du surnageant sont prélevés, puis mélangé avec 500 µL de

phénol à 5% et 2,5 mL d'acide sulfurique concentré (H₂SO₄). Le mélange est ensuite incubé pendant 20 minutes à température ambiante (**Dubois et al., 1956 ; Nielsen, 2010**).

L'absorbance est mesurée à 490 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le glucose pur est utilisé pour l'établissement de la courbe étalon, permettant de déterminer la teneur en glucides des échantillons.

La concentration de carbohydrates est déterminée à partir d'une courbe étalon de glucose réalisé avec une gamme de concentrations allant de 0 à 1 mg/mL. Cette dernière est préparée à partir de solution mère de glucose de 1 mg/mL. Les résultats sont exprimés en mg/mL

II.2.6. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Préparation de l'homogénat cellulaire

La Biomasse de *D.salina* a été homogénéisée dans un tampon phosphate à 50 mM, pH 7.2, à l'aide d'un homogénéisateur en teflon à 4°C (3x10sec). Après 3 cycles de congélation-décongélation les homogénats sont centrifugés 20 min à 10000g, 4°C. Les surnageants ainsi récupérés sont conservés à -20°C jusqu'aux dosages (protéines, MDA et catalase) (**Blandizzi et al., 2005**).

La concentration des protéines est mesurée par la méthode colorimétrique de Bradford. Cette méthode est basée sur l'interaction du bleu de coomassie G250 avec les protéines, formant un complexe de couleur bleue qui absorbe fortement à 595 nm.

100 µL de surnageant ont été mélangé avec 2 mL de réactif de Bradford. Le mélange est incubé pendant 20 minutes à l'abri de la lumière.

La concentration protéique est proportionnelle à l'intensité de l'absorption, elle est déterminée à partir d'un courbe étalon établie au préalable avec la protéine BSA (*Bovine Serum Albumin*) à 0.1% (**Bradford, 1976**).

Les résultats sont exprimés en mg/mL.

II.2.7. Dosage du taux Malondialdéhyde (MDA)

Le malondialdéhyde (MDA) est un index direct de la peroxydation lipidique. La méthode est basée sur la détermination, par spectrophotométrie à 532nm, de l'intensité de la couleur rose produite après réaction de deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA)

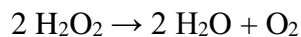
avec les peroxydes lipidiques ou les espèces réactives de TBA (TBARS) entre autre le MDA (Lefèvre *et al.*, 1998).

100 µL d'homogénat cellulaire sont ajoutés à un mélange réactionnel contenant: 375µL d'acide acétique 20% pH 3.5, 375µL d'acide thiobarbiturique (TBA) à 0.8%, 50µL de sodium dodecylsulfate (SDS) à 8,1%. Le volume réactionnel est complété à 1.0 ml avec de l'eau distillée est incubé à 95°C pendant 1heure (Ohkawa *et al.*, 1979).

La réaction est arrêtée par un refroidissement rapide (bain glacial) et une centrifugation à 3000g pendant 10 min et à 4°C. La densité optique est mesurée à 550 nm et les résultats sont exprimés en nmoles/mg de protéine (Ohkawa *et al.*, 1979).

II.2.8. Dosage de l'activité catalase

La catalase est une enzyme ubiquitaire localisée dans les peroxysomes et dans le cytosol (Aebi, 1984). Elle catalyse la réaction de décomposition du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène (Jevva *et al.*, 2015).



Le dosage de l'activité catalase a été effectué, par suivi de la cinétique de transformation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et oxygène. 50µl d'homogénat tissulaire sont mélangés à 950 µL de tampon phosphate 50mM, pH 7.4. La réaction est déclenchée par l'addition de 500 µL d'H₂O₂ à 30 mM. La cinétique de la réaction est suivie pendant 2 min à 25°C. L'activité de la catalase est mesurée par une diminution de l'absorbance à 240nm, elle est exprimée en U/min/mg de protéines (Aebi, 1984).

Une unité de catalase correspond à $K/6,93 \times 10^3$. $K = (2,3/t) (\log A1/A2)$ où t : temps en seconde ; A1 : Absorbance à temps zéro et A2 : Absorbance à 2 minutes.

II.3. Etude statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. Le logiciel GraphPadPrism v. 6.0 a été utilisé pour analyser les données.

Le test ANOVA unidirectionnel avec un test post hoc de Tukey est utilisé pour comparer les différences entre les groupes expérimentaux, avec $P < 0,05$ étant considéré comme statistiquement significatifs.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III. Résultats et Discussion

III.1. Caractéristique morphologique de *Dunaliella salina*

Dans cette étude, diverses cultures de *Dunaliella salina* ont été cultivées à partir d'une culture mère, dans un milieu liquide Johnson ajusté à une salinité de 1 M, l'expérimentation s'est déroulée en deux phases : une phase de croissance active (phase verte) suivie d'une phase de stress (phase orange), visant à observer les adaptations morphologiques de la souche en réponse aux conditions environnementales.

III.1.1. Aspect macroscopique de la culture de *Dunaliella salina*

Au niveau macroscopique aucun changement notable de couleur n'a été observé dans les flacons de culture. Contrairement aux attentes, le milieu est resté trouble tout au long de l'expérience, sans virage vers le vert (croissance active) ni vers l'orange (synthèse accrue de caroténoïdes sous stress) (**Figure 5**).

Ce manque de virage colorimétrique pourrait être attribué au faible rendement initial de la souche ainsi qu'une densité cellulaire modérée insuffisante pour générer un changement visible à l'œil nu.

Néanmoins, l'observation microscopique a permis de mettre en évidence plusieurs structures morphologiques caractéristiques du cycles de vie et de l'adaptation de *D.salina* , confirmant ainsi une réponse biologique bien présente et révélatrice de sa capacité adaptative aux conditions de culture expérimentales.

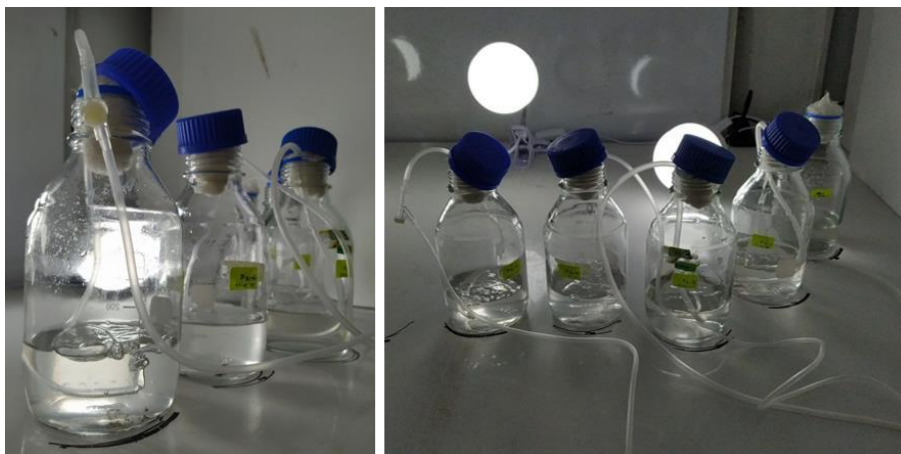


Figure 5. Photographie des flacons de culture contenant *Dunaliella salina* dans un milieu Johnson à 1M de NaCl.

III.1.2. Micromorphologies

Pendant toute la période d'incubation, des observations microscopiques ont été réalisées pour suivre l'évolution morphologique des cellules. Ces résultats ont mis en lumière une grande variabilité dans la morphologie, propre au genre *Dunaliella*, en réponse aux conditions du milieu, cette étude a été menée en se référant au guide de **Borowitzka et Siva (2007)**.

Les cellules de *Dunaliella* présentent une variabilité morphologique, elles sont d'une forme ovoïde ou sphérique selon les conditions de la culture.

Les micrographies montrent des cellules typiques en phase verte, en plusieurs formes : sphérique, ovoïde et ellipsoïde, dotées de deux flagelles pour leur mobilité et présentant une paroi fine. Les cellules en micrographie sont en cours de division, témoignant d'une activité mitotique normale.

Cependant, en condition de stress telles qu'une forte salinité ou stress oxydatif adoptes différentes formes de résistante représentées dans les figures.

Les formes sont non mobiles où les cellules s'agrègent c'est un stade de défense temporaire, déclenchée par la phase de stress appelée le stade de palmella. Selon **Borowitzka et Siva (2007)**, ce stade peut être causé par une déficience en nutriments ou une basse température (**Borowitzka et Siva., 2007**).

La forme aplanospore, forme non mobile de couleur orangée, due à la synthèse accrue de caroténoïdes permettant à la microalgue de survivre aux conditions de stress.

L'observation microscopique montre une fusion cytoplasmique entre deux cellules, qui donne naissance à une zygospore, structure sphérique paroi épaisse et foncée formée en réponse d'un stress sévère pour une survie à long terme.

III.2. Résultats du choix de salinité optimale pour la croissance

Le nombre de cellule de *D. salina* a été calculé en mesurant quotidiennement la densité optique à 660 nm des cultures de microalgue dans différentes concentrations de NaCl (1 M, 1.5 M, 2 M et 3 M) pendant 15 jours, afin de déterminer la salinité optimale pour la croissance.

Nos résultats montrent que dès les premiers jours, la culture en présence de 1 M de NaCl a montré une croissance régulière et soutenue, atteignant un nombre maximale de cellule de 4×10^4 cellules/mL au jour 10. Cette valeur représente le pic de croissance le plus élevé observé parmi toutes les conditions testées.

En comparaison, les cultures à 1.5M, 2 M et 3 M ont présenté une croissance plus lente et une biomasse inférieure. À 1.5 M de NaCl, la croissance est restée modérée tout au long de l'expérience, avec un maximum de 3×10^4 cellules/mL à J10. La salinité de 2 M a montré une légère amélioration avec un pic de $3,2 \times 10^4$ cellules/mL à J15, sans toutefois dépasser la croissance observée à 1 M. Enfin, à 3 M, bien que la croissance ait été plus soutenue entre J5 et J8 ($3,1 \times 10^4$ cellules/mL), elle est restée inférieure à celle enregistrée à 1 M.

Ces résultats indiquent que la salinité de 1 M est la plus favorable à la croissance de *D. salina* dans les conditions expérimentales utilisées, tandis que des concentrations salines plus élevées semblent exercer un stress osmotique limitant l'accumulation de biomasse.

Ces résultats sont en accord avec plusieurs études. Les travaux de **Yaiche achour et al. (2019)** sur une souche algérienne de *D. salina* DunaDZ1 ont montré que 1M de salinité était le bon choix pour une croissance optimale. **Al-Mhanna et al. (2023)** ont rapporté que la croissance optimale de *D. salina* est observée à une salinité de 50 g/L NaCl (environ 0,85 M), avec une biomasse maximale de 1,11 g/L. En utilisant la méthode du simplexe, ils ont déterminé que la salinité optimale pour la production était de 64 g/L (environ 1,1 M), avec une biomasse atteignant 1,23 mg/mL.

De même, **AL-Sultan et Abdulla (2023)** ont étudié une souche de *D. salina* isolée de bassins de saumure en Irak et ont constaté une croissance optimale à une salinité de 0,5 M NaCl, bien que la souche puisse survivre dans une gamme de salinité allant de 0,25 à 2 M NaCl. Les travaux de **Ahmed et al. (2017)** ont également évalué l'effet de différentes concentrations en NaCl, allant de 0,5 à 2,5 M sur la souche *D. salina* SA 134 et ont observé une densité et un nombre cellulaire maximale à une concentration de 2M.

Ces résultats suggèrent que la salinité est dépendante de la souche utilisée. Ainsi, bien que *D. salina* soit capable de tolérer (halotolérante) une large gamme de salinités, la croissance optimale est généralement observée à des concentrations modérées de NaCl, autour de 0,5 à 1,1 M. En conséquent, ce niveau de salinité permet une meilleure division et un développement rapide tandis que des salinités plus élevées peuvent induire un stress osmotique, réduisant la croissance cellulaire.

III.3. Evolution des pigments dans différentes salinités

Le dosage des pigments chez *Dunaliella salina* permet de suivre l'état physiologique de la microalgue, d'évaluer son activité photosynthétique, de détecter des réponses au stress, et d'optimiser la production de composés d'intérêt comme le β -carotène.

À 1M de NaCl, la concentration en chlorophylle a, augmente régulièrement et atteint un pic de 2 $\mu\text{g/mL}$ à J7, suivi d'une légère baisse. Ceci indique une activité photosynthétique optimale et une croissance à J7.

À 1,5 M, on observe une augmentation progressive jusqu'à J6-J7 avec un taux de chlorophylle a de 1 $\mu\text{g/mL}$, puis une baisse progressive. Ceci suggère une saturation du système photosynthétique ou l'apparition d'un stress osmotique modéré

À 2 M, le taux de chlorophylle a augmenté progressivement et atteint le maximum à J8 (1 $\mu\text{g/mL}$), puis un déclin est observé. À 3 M, les taux de chlorophylle a étaient faibles en début de culture mais on observe une forte accumulation à J14 (2 $\mu\text{g/mL}$). Ces résultats traduisent une adaptation tardive aux conditions hypersalines.

La chlorophylle b, pigment accessoire, varie selon les besoins d'absorption lumineuse complémentaire. Elle suit une évolution parallèle à celle de la chlorophylle a.

La chlorophylle b augmente progressivement pour atteindre son maximum à J7 pour les concentrations en NaCl de 1M et 1.5M où les valeurs étaient de 2 $\mu\text{g/mL}$ et 1 $\mu\text{g/mL}$, respectivement, au-delà de J7 la concentration diminue progressivement.

Pour les salinités de 2M et 3M le même schéma est observé avec une augmentation progressive et un maximum de concentration de chlorophylle b atteint à J9, de 2.2 et 1.6 respectivement.

La chlorophylle b, pigment accessoire impliqué dans la capture complémentaire de lumière, suit globalement la même dynamique que la chlorophylle a, avec des pics décalés selon la concentration en NaCl, reflétant une adaptation des antennes photosynthétiques pour optimiser la captation lumineuse en conditions de croissance active.

Les caroténoïdes totaux montrent une accumulation importante à 1 M de NaCl, avec un maximum à J7 (1 $\mu\text{g/mL}$), synchronisé avec les chlorophylles suggérant une réponse photoprotectrice liée à une forte activité photosynthétique.

À 1.5 M, la forme de la courbe est comparable, mais les valeurs sont plus basses J7 (0.35

µg/mL). À 2 M, la forme de la courbe est comparable, avec un pic à J8 (1.20 µg/mL). Ceci pourrait indiquer une production moindre de stress oxydatif à ces concentrations intermédiaires.

À 3 M, la détection des caroténoïdes est faible avec maximum obtenu à J7 (0.31 µg/mL) traduisant soit une réduction de l'activité photosynthétique, soit une modification du métabolisme secondaire.

Nos résultats suggèrent que l'évolution des pigments chez *Dunaliella salina* cultivée à différentes concentrations de NaCl révèle une forte sensibilité aux conditions salines, reflétant les mécanismes d'adaptation à l'environnement. De plus, la synthèse pigmentaire n'est pas complètement bloquée, même sous des conditions de stress intense

Des études récentes confirment que des conditions salines modérées favorisent la croissance et la photosynthèse chez *D. salina* (Yaiche achour et al., 2019).

Ainsi, la culture dans différentes salinité révèle que la croissance de *D. salina* et la production de pigments varient considérablement en fonction de la concentration en NaCl. La croissance ainsi que la production des pigments atteint son pic à une salinité optimale, déterminée expérimentalement à 1M NaCl, qui se révèle être la concentration la plus adéquate pour la culture dans nos conditions.

À des niveaux de salinité plus élevés, la croissance diminue en raison du stress osmotique, tout comme les niveaux de chlorophylle a et b, qui augmentent jusqu'à atteindre un optimum avant de redescendre à des salinités élevées, indiquant une adaptation visant à limiter l'absorption de lumière et à réduire le stress oxydatif. En revanche, les caroténoïdes continuent d'augmenter avec la salinité, atteignant leur maximum dans des milieux hypersalins.

III.4. Résultats de la phase de croissance de *D.salina*

III.4.1. Croissance de la souche *D.salina* phase de croissance

La croissance de la souche *D.salina* a été suivie sur une durée de 15 jours dans un milieu Johnson contenant la salinité optimale identifiée précédemment (1M).

Les résultats de la croissance en milieu Johnson à 1M montrent une augmentation progressive du nombre de cellules jusqu'au 15^{ème} jour, atteignant un maximum de croissance de $8,1 \times 10^4$ cellules/mL. Cette évolution reflète une dynamique de croissance

caractéristique, comprenant une phase de latence initiale relativement courte observée entre J1 et J3, durant laquelle les cellules s'adaptent progressivement aux conditions du milieu, suivie d'une phase exponentielle marquée entre le 4^{ème} et le 14^{ème} jour. En fin de culture, une légère stabilisation de la croissance est notée, indiquant une entrée en phase stationnaire.

La dynamique de croissance observée chez *Dunaliella salina* à une concentration de 1M de NaCl témoigne d'une adaptation physiologique efficace à un stress osmotique modéré.

La phase de latence relativement courte indique une acclimatation rapide des cellules à leur environnement hypersalin et aux nouvelles conditions de culture. Cette période est cruciale, car elle permet aux cellules de réactiver leur métabolisme et de se préparer à la division cellulaire active. Par la suite, la phase exponentielle observée entre J4 et J14, durant laquelle la vitesse de croissance est maximale traduit un environnement favorable avec une disponibilité suffisante en nutriments et une activité métabolique efficace permettant aux cellules de se diviser activement, cette phase qui conduit à un pic de croissance au 15^{ème} jour qui représente l'optimum dans les conditions expérimentales. Cependant, vers la fin de l'expérience, un ralentissement du taux de croissance et une transition en phase stationnaire lié à l'épuisement partiel des nutriments, l'accumulation des déchets ou une très forte densité de cellules empêchant la lumière de bien circuler (Mishra et al., 2008).

Donc la concentration de 1M de NaCl offrent un équilibre entre le stress osmotique stimulant et tolérable, permettant à la microalgue de maintenir son activité métabolique avec le maintien d'une viabilité cellulaire durable. L'ensemble de ces résultats concorde avec les travaux précédents rapportés à la littérature, qui souligne que *D. salina* présente une croissance maximale entre 1 et 2M de NaCl, ce qui confirme la validité du choix expérimental (Yaiche Achour et al., 2019 ; Al-Mhanna et al., 2023).

III.4.2. Production de pigments en phase de croissance

Les résultats de la production des pigments photosynthétiques (chlorophylles a et b) de *Dunaliella salina* pendant les 15 jours de la phase de croissance dans le milieu Johnson.

Le dosage des pigments photosynthétiques chlorophylles a et b durant la phase de croissance de *D.salina* montre une augmentation progressive des concentrations de ces derniers durant les premiers jours de la culture .Cette augmentation s'est poursuivie jusqu'à atteindre un maximum de 2,05 µg/mL à J7 pour la chlorophylle a, et un pic à J10 de 2,5 µg/mL en chlorophylle b, suivi par une diminution des teneurs des deux pigments malgré la poursuite de la croissance cellulaire.

L'évolution progressive des pigments photosynthétiques indiquée aux premiers jours de culture reflète une réponse adaptative positive de *D.salina* à la salinité de 1M, cette salinité semble constituer une condition favorable à l'activation de la photosynthèse. Ces observations suggèrent que dans un environnement salin modéré, *D.salina* optimise son métabolisme photosynthétique pour assurer une croissance efficace (**Katz et al., 2007**).

Cependant le déclin des teneurs observé en chlorophylles dans notre résultat peut s'expliquer par plusieurs facteurs physiologiques. D'une part, une photoinhibition pourrait survenir à la suite d'une exposition à une forte intensité lumineuse, affectant ainsi une dégradation partielle des pigments chlorophylliens (**Sing et al., 2015**). D'autre part, un ombrage intraculturel pourrait survenir à cause de l'accumulation de biomasse en limitant la pénétration de la lumière et réduisent la synthèse de chlorophylle pour adapter leur métabolisme à une lumière moins disponible (**Caia , 2018**).

Par ailleurs, cette diminution pourrait également refléter une transition métabolique des cellules, passant d'un métabolisme de croissance active vers un métabolisme de maintien ou de stress, ou l'énergie est moins dirigée vers la photosynthèse et davantage vers la synthèse de caroténoïdes en particulier le β -carotène, jouent un rôle essentiel dans la protection contre le stress oxydatifs (**Ramachandran et al., 2023**).

III.4.3. Résultats du dosage des protéines en phase de croissance

Les résultats du dosage des protéines de *D.salina* révèlent une augmentation progressive des concentrations protéiques qui atteint son maximum à J15 (1.7 mg/mL). Ces résultats reflètent une synthèse protéique active en lien avec la multiplication cellulaire et la formation des structures cellulaires essentielles ou métabolisme de la souche *D.salina*.

Cette production de protéines indique une activité métabolique intense, en particulier la synthèse d'enzymes et de protéines antioxydantes, qui participent à la protection cellulaire contre les stress environnementaux. La disponibilité des nutriments en particulier de l'azote

influence également cette dynamique (Yaiche achour et al., 2021).

La relation entre la croissance cellulaire et l'augmentation des protéines indique que *D.salina* utilise ses ressources pour produire de la biomasse, un signe essentiel de sa santé physiologique et de son adaptation aux conditions de culture (Kadkhodaei et al., 2015).

Par ailleurs, la régulation des protéines, notamment des enzymes antioxydantes, indique la capacité de la microalgue à s'adapter aux stress oxydatifs, ce qui renforce ses mécanismes de défense (Mishra et Jha., 2011).

III.4.4. Résultats du dosage d Malondialdéhyde en phase de croissance

Le MDA, produit final de la peroxydation des lipides membranaires sous l'action des espèces réactives de l'oxygène, est un indicateur traditionnel du stress oxydatif.

La concentration de MDA de *D.salina* durant la phase de croissance a montré une variation modérée mais significative selon les jours de culture. Au début de la culture, les résultats montrent une légère hausse du taux de MDA, indiquant une réponse métabolique normale lors de la reprise de croissance dans un environnement salin, où l'activité cellulaire s'accroît et la production de ROS augmente.

La concentration en MDA reste relativement stable ou diminue légèrement entre J5 et J10, correspondant à une phase de croissance exponentielle et à une santé cellulaire optimale. Durant cette période, les systèmes de défense antioxydants semblent être efficacement mobilisés pour neutraliser les ROS produits, maintenant ainsi un faible niveau de peroxydation lipidique (Figure 12) (Fakhry et El-Sheekh., 2011).

Néanmoins, une légère augmentation du MDA à la fin de la culture peut indiquer une fatigue métabolique ou un début de stress intracellulaire causé par l'accumulation de

biomasse, l'épuisement des nutriments ou une densité cellulaire élevée. Ce phénomène est fréquent à la fin de la phase de croissance, lorsque les capacités de régulation oxydative des cellules diminuent (**Fakhry et El-Sheekh., 2011**).

Nos résultats suggèrent que les niveaux modérés de MDA durant toute la culture indiquent que *D. salina* a bien toléré le stress osmotique initial lié à la salinité et a maintenu un état physiologique relativement stable, ce qui confirme sa robustesse en conditions extrêmes.

III.4.5. Résultats du dosage de la catalase en phase de croissance

Afin d'évaluer la réponse antioxydante de *D.salina* dans les conditions de culture à 1M de NaCl, l'évolution de l'activité de la catalase a été suivie au cours de la phase de croissance.

L'activité de la catalase de *D.salina* en phase de croissance suit le même schéma que le taux de MDA. Elle montre une faible activité enzymatique aux premiers jours de la culture à J3 et J6, suivie d'une augmentation modérée en J8 atteignant environ 0,52U /min/mg de protéines .Cette activité diminue légèrement à J10, avant d'atteindre un pic marqué à J15 avec une valeur de 1,68 U/min/mg de protéines, ce qui indiquent une activité significative de la catalase en fin de culture.

L'activité enzymatique faible observée aux jours J3 et J6 indique que les cellules de *D.salina* étaient encore en phase d'adaptation sans stress oxydatif majeur. L'augmentation notée à J8 coïncide avec l'intensification de la division cellulaire, période durant laquelle le métabolisme cellulaire produit davantage d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), nécessitant une réponse enzymatique accrue (**Schieber et Chandel., 2014**). Cependant la chute au 11^{ème} jour pourrait s'expliquer par une redistribution métabolique temporaire ou par une saturation partielle des mécanismes de défense, surtout si la production de ROS dépasse la capacité des enzymes à les neutraliser (**Caia, 2018**). Toutefois, le pic observé à J15 témoigne d'une activation intense du système antioxydant, probablement en réponse à un stress cellulaire causé par l'épuisement des nutriments, l'accumulation de déchets métaboliques ou la limitation en lumière dans une culture dense.

Ce comportement est caractéristique des microalgues en conditions de stress, où la catalase joue un rôle essentiel dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), qui soulignent la plasticité physiologique de *D.salina* et sa capacité à maintenir l'intégrité cellulaire dans un environnement devenu oxydatif (**Apel et Hirt., 2004**).

III.4.6. Résultats de dosages de carbohydrates phase de croissance

Les résultats indiquent une augmentation progressive de la concentration en glucides en phase de croissance pour atteindre un maximum de 1.22mg/mL à J10. Cette concentration diminue de moitié à J15 et atteint 0.69 mg/mL. L'augmentation illustre l'accumulation de réserves énergétiques sous forme de sucres, qui sont essentielles pour la croissance cellulaire et la synthèse de biomasse.

L'augmentation des glucides peut servir de réserve énergétique alternative lorsque la photosynthèse est moins performante ou que la cellule prépare une phase de stress (Sheehan, J., et al. (2017)). De plus, la comparaison avec d'autres biomarqueurs indique que la production de glucides est un indicateur clé de la santé cellulaire et de la réponse au stress oxydatif. Les travaux ont mis en évidence que la salinité a un impact considérable sur la production de biomasse et la synthèse de métabolites secondaires chez *D. salina*. Une salinité optimale favorise la croissance et la production de glucides, alors qu'un stress salin excessif entraîne une augmentation de la concentration en caroténoïdes et altère la composition biochimique globale (Sheehan et al., 2017).

Ainsi, l'augmentation progressive des glucides durant la phase de croissance de *D. salina* reflète une croissance saine et une adaptation métabolique aux conditions de culture, avec les glucides jouant un rôle clé dans la gestion de l'énergie et la protection cellulaire contre les fluctuations environnementales.

III.5. Résultats de la phase de stress salin, de lumière et de carence en azote de *D. salina*

Les résultats de la culture de *D. salina* en phase de stress montrent une augmentation progressive du nombre de cellules dans les différentes salinités à 1M, 2M, 3M et 4M. Les cultures à 1M et à 2M montrent une légère augmentation progressive du nombre de cellules pendant les quatre premiers jours, atteignant un pic modeste à J6 (1M : 3×10^4 cellules/mL et 2M : 4×10^4 cellules/mL) suivi d'une stabilisation jusqu'à J15. Ce schéma reflète une stratégie de survie avec une activité cellulaire minimale.

En revanche, les cultures à 3M et à 4M présentent une stagnation qui est presque immédiate depuis le début de l'expérience, sans phase de croissance notable. Aucun pic de croissance n'est observé dans ces deux conditions, indiquant une transition rapide vers une phase stationnaire ou un arrêt métabolique complet.

La phase de stress combiné (forte lumière et absence de nitrate) influence la croissance de *D.salina* de façon différente selon les cultures.

Dans les cultures à 1M et à 2M, une légère croissance est observée. Cela montre que les cellules tentent de s'adapter malgré les conditions difficiles. Cette faible activité pourrait venir de l'utilisation des réserves accumulées pendant la phase de croissance. Même sans nitrate et sous forte lumière, les cellules gardent une activité minimale pour survivre (**Lamers et al., 2010**).

En revanche, dans les cultures à 3M et à 4M, la croissance est presque nulle dès le début. Cela montre que le stress est trop fort pour ces cultures. L'intensité lumineuse élevée peut provoquer un stress photo-oxydatif, tandis que le manque de nitrate empêche la synthèse des protéines nécessaires à la division cellulaire. Combinés, ces facteurs entraînent un arrêt rapide de la croissance et une perte progressive de la viabilité cellulaire (**Lamers et al., 2010**).

III.6. Evolution de pigments photosynthétiques et caroténoïdes en phase de stress

La chlorophylle a atteint son pic dans la culture du flacon à 1M à J6, indiquant une activité photosynthétique encore assez stable malgré les conditions de stress subies. La courbe montre une augmentation constante du J1 au J6, suivie d'une phase de stabilisation avant une légère baisse à partir du J8.

Dans la culture à 2M une accumulation plus lente est observée avec un pic retardé autour du 6ème jour. Les niveaux globaux plus faibles indiquent un début de déséquilibre dans le métabolisme. La culture 3M présente une évolution comparable mais plus faible: une accumulation modérée jusqu'au J9, puis une diminution. Ce profil témoigne de l'impact le plus prononcé du stress combiné sur la biosynthèse de la chlorophylle. Enfin, dans la culture à 4M la chlorophylle a est à peine détectée: une trace légère apparaît entre J2 et J8 puis disparaît rapidement. Cela montre qu'à ce niveau de stress, l'activité photosynthétique est fortement inhibée, bien que la cellule maintienne une activité minimale.

La chlorophylle b suit une évolution parallèle à celle de la chlorophylle a. La teneur dans la culture à 1M augmente jusqu'au sixième jour, où elle atteint son maximum, avant de diminuer graduellement. A 2M la courbe indique une accumulation plus progressive avec des valeurs généralement plus faibles, un pic est observé vers J6, ce qui suggère une régulation plus lente du système photosynthétique. Dans la culture à 3M, la concentration demeure très faible tout

au long de la période de culture, avec une légère hausse notable entre J6 et J7 indiquant une activité pigmentaire réduite. Dans la culture à 4M, la chlorophylle b est faible mais clairement détectée. Cela confirme que la synthèse de la chlorophylle b est l'une des premières fonctions impactées par le stress combiné, sans être complètement bloquée.

Le dosage des caroténoïdes en phase de stress révèle qu'à 1M une accumulation importante est observée, avec un pic marqué entre le J6 et J7, en parallèle avec les chlorophylles. Ceci indique une activation accrue des défenses antioxydantes en réponse à la production de ROS provoquée par des conditions stressantes. Dans la culture de 2M la courbe présente une similarité, mais les valeurs sont inférieures. Dans la culture de 3M, l'évolution est progressive et modérée, avec un pic peu prononcé vers le J9, indiquant une réponse antioxydante diminuée mais toujours détectable. Cependant, dans la culture à 4M, l'accumulation des caroténoïdes est très limitée. Ainsi, malgré les conditions extrêmes, la cellule tente d'activer ses mécanismes de défense, mais ses capacités sont fortement compromises.

L'étude de la dynamique des pigments photosynthétiques chez *D.salina* en situation de stress montre une réponse adaptative qui varie en fonction de l'intensité des conditions environnementales.

En cas de stress modéré, la cellule conserve momentanément des niveaux de chlorophylle a, b et de caroténoïdes, ce qui reflète une tentative de préserver la photosynthèse et d'activer les défenses antioxydantes (**Ben-Amotz et Avron, 1983**).

Cependant, en présence d'un stress intense, ces pigments chutent considérablement, indiquant une désorganisation des structures photosynthétiques et un affaiblissement des mécanismes de protection. Ces résultats confirment la plasticité physiologique de *D. salina*, mais mettent en évidence ses limites adaptatives en conditions extrêmes. Ainsi, cela indique que la synthèse pigmentaire n'est pas complètement bloquée, même sous des conditions de stress intense (**Tammam et al., 2011**).

Conclusion et Perspectives

Les résultats obtenus démontrent que, parmi les conditions testées, une salinité de 1 M constitue le milieu le plus favorable à la croissance de *Dunaliella salina*, avec une accumulation optimale de biomasse. À l'inverse, des concentrations plus élevées (1,5 M, 2 M et 3 M) induisent un stress osmotique limitant la prolifération cellulaire. Toutefois, même sous stress salin intense, la synthèse pigmentaire reste active, indiquant une certaine plasticité physiologique.

Les observations morphologiques ont révélé que les cellules adoptaient des formes variables en fonction des conditions : sphérique, ovoïde ou ellipsoïde en phase de croissance, tandis qu'en phase de stress, elles présentaient des formes de résistance typiques telles que les zygospores et palmella.

En conditions optimales (milieu Johnson à 1 M), *D. salina* a montré une dynamique de croissance caractéristique, avec un pic de biomasse à J15. La synthèse de chlorophylle a et b a atteint un maximum respectivement à J7 et J10. Les niveaux les plus élevés de protéines, de malondialdéhyde (MDA) et d'activité catalase ont également été enregistrés à J15, tandis que les glucides ont culminé à J10.

En phase de stress (haute salinité, forte intensité lumineuse et carence azotée), une réduction marquée de la croissance et de la chlorophylle a/b a été observée, accompagnée d'une augmentation des caroténoïdes, traduisant une réponse adaptative de l'algue face aux contraintes environnementales.

En perspectives il serait intéressant de :

- Optimiser d'autres paramètres de culture (composition du milieu, température, sources d'azote et de carbone) pour maximiser la biomasse et la production de métabolites.
- Étendre l'analyse à d'autres biomolécules d'intérêt : lipides, acides gras polyinsaturés, β -carotène.
- Rechercher de nouvelles souches Algériennes avec un meilleur rendement de biomasse et de production de biomolécules.
- Valoriser les biomolécules extraites dans des applications cosmétiques, notamment la formulation de crèmes antioxydantes et anti-âge.
- Évaluer le potentiel antioxydant et antimicrobien des extraits de *D. salina in vitro* et *in vivo*, pour confirmer leur utilité dans les secteurs nutraceutique, pharmaceutique ou cosmétique.

- Étudier les réponses transcriptomiques et protéomiques de *D. salina* face à différents stress (salins, lumineux, nutritifs) pour identifier les gènes et protéines clés impliqués dans la tolérance et la biosynthèse de métabolites secondaires.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

A

ANDERSEN, R.A. Algal Culturing Techniques. Academic Press, 2005

AVRON M., BEN-AMOTZ A., 1992- *Dunaliella: physiology, biochemistry, and biotechnology*. 1^e édition. CRC Press, Boca Raton, FL. 256 p.

Apel, A.C., Weuster-Botz, D., 2015. Engineering solutions for open microalgae mass cultivation and realistic indoor simulation of outdoor environments. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 38, 995–1008. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1363-1>

Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol.* 2004;55:373-99. doi: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701. PMID: 15377225.

acobLopes, E., Maroneze, M. M., Deprá, M. C., Sartori, R. B., Dias, R. R., & Zepka, L. Q. (2019). Bioactive food compounds from microalgae: An innovative framework on industrial biorefineries. *Current Opinion in Food Science*,

Apel, A. C., & WeusterBotz, D. (2015). Engineering solutions for open microalgae mass cultivation and realistic indoor simulation of outdoor environments. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38(6), 995–1008

B

BOROWITZKA M., 1988- Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *Journal of Applied Phycology*, vol 4 : 267–279p

Borowitzka MA, Siva C (2007) The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. *Journal of Applied Phycology* 19:567–590

Ben-Amotz, A Accumulated {beta}-Carotene of *Dunaliella bardawil* in Protecting the Alga against Damage by Excess Irradiation. *Plant Physiology*, 91(3), 1040.

Borowitzka, Michael A. 1990. The mass culture of *Dunaliella salina*. Proceedings of Regional Seafarming Development and Demonstration Project - Bangkok. (c'est pas sur pdf DS-Sce)

Borowitzka, M. A. 1999. Commercial production of microalgae : ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, 70(1-3), 313–321.

Baroli I, Melis A (1996) Photoinhibition and repair in *Dunaliella salina* acclimated to different growth irradiances. *Planta* 198:640–646

B. Williams, P. J. le, & L. Laurens, L. M. (2010). Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. *Energy & Environmental Science*, 3(5), 554–590. <https://doi.org/10.1039/B924978H>

Bougaran & Saint-Jean B., 2014. Micro-algues : de petits végétaux aux grande Promesses! *Biofutur*, (360), 28-31.

Bejjani, R., Carello, C., & Turvey, M. T. (2019). Postural control underlying head movements while tracking visual targets.

Ben-Amotz, A., & Avron, M. (1983). On the mechanism of osmoregulation in *Dunaliella*. *Plant Physiology*, 72(3), 593–595.

Besson, A. (2013). Étude multi-échelle de la récolte de *Dunaliella salina* – Développement d'un procédé d'autofloculation-flottation de microalgues (Thèse de doctorat, Université de Toulouse). Archives ouvertes TEL

Besson, A., & Guiraud, P. (2013). High-pH-induced flocculation–flotation of the hypersaline microalga *Dunaliella salina*. *Bioresource Technology*, 147, 464–470

Besson, M., Pelloux, Y., Dilleen, R., Belin-Rauscent, A., Nadal, R., Zembrzycki, A., ... & Belin, D. (2013). Cocaine modulation of frontostriatal expression of Zif268, D2, and 5-HT2C receptors in high and low impulsive rats. *Neuropsychopharmacology*, 38(10), 1963–1973

Borowitzka ,McCoy, S. J., Poeschel, C. M., Cornwall, C. E., Comeau, S., Kranz, S. A., Spindel, N. B., M. A. (2023). Calcification in the coralline red algae: A synthesis. *Phycologia*,
Borowitzka, M. A. (1999). Commercial production of microalgae: Ponds, tanks, tubes and fermenters. *Biotechnology Advances*,

C

Cantin, I. (2010). La Production de Biodiesel à Partir des Micro Algues ayant un Métabolisme Hétérotrophe, Canada, Centre Universitaire de Formation en Environnement, Université de Sherbrooke, 87 p., 2010, A. Demirbas and M.F. Demirbas, *Algae Energy: Algae as a New Source of Biodiesel*, London, Springer, pp. 29 – 47, 2010.

Cadoret, Jean-Paul, & Bernard, Olivier. 2008. La production de biocarburant lipidique avec des microalgues - promesses et défis. *Journal de la Société de Biologie*, 202(3), 201–211.

Cifuentes AS, González MA, Inostroza I, Aguilera A (2001) Reappraisal of physiological attributes of nine strains of *Dunaliella* (Chlorophyceae): growth and pigment content across a salinity gradient. *Journal of Phycology* 37:334–344

Caia, M. (2018). Caractérisation et modélisation des interactions au sein d'un assemblage microalgue-cyanobactérie : cas de *Dunaliella salina* et *Crocospaera watsonii*. Thèse de doctorat, Montpellier, SupAgro.

Cadoret, J.-P., & Bernard, O. (2008). La production de biocarburant lipidique avec des microalgues : promesses et défis [Lipid biofuel production with microalgae: potential and challenges]. *Journal de la Société de Biologie*, 202(3),

Cantin, I. (2010). La production de biodiesel à partir des microalgues ayant un métabolisme hétérotrophe (Maîtrise en environnement, Université de Sherbrooke). Centre universitaire de formation en environnement.

Cardozo, K. H. M., Guaratini, T., Barros, M. P., Falcão, V. R., Tonon, A. P., Lopes, N. P., Campos, S., Torres, M. A., Souza, A. O., Colepicolo, P., & Pinto, E. (2007). Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(1–2), 60–78

Costa Santos, A., Willumsen, J., Meheus, F., Ilbawi, A., & Bull, F. C. (2023). The cost of inaction on physical inactivity to public healthcare systems: A population attributable fraction analysis. *The Lancet Global Health*, 11(1), e32–e39.

Costa, C. S., Flores, T. R., Wendt, A., Neves, R. G., Assunção, M. C. F., & Santos, I. S. (2018). Sedentary behavior and consumption of ultra-processed foods by Brazilian adolescents: Brazilian National School Health Survey (PeNSE), 2015. *Cadernos de Saúde Pública*, 34(3)

Croft, M. T., Lawrence, A. D., Raux-Deery, E., Warren, M. J., & Smith, A. G. (2005). Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature*, 438(7064), 90–93.

D

Deprá M.C., Mérida L.G.R ., de Menezes C.R., Zepka L.Q . et Jacob-Lopes E.(2019).A new hybrid photobioreactor design for microalgae culture. Chemical Engineering Research and Design, Volume 144 : Pages 1-10.

Del Campo, J. A, Garcia-Gonzalez, M., & Guerrero, M. G. 2007. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production : current state and perspectives. Applied Microbiology and Biotechnology, 74(6), 1163–1174.

Dibenedetto, Angela. 2011. The potential of aquatic biomass for CO₂-enhanced fixation and energy production. Greenhouse Gases : Science and Technology, 1(1), 58–71.

DiBenedetto, E. (2011). Classical mechanics: Theory and mathematical modeling. Springer

F

Fisher, M., Gokhman, I., Pick, U., Zamir, A., 1996. A salt-resistant plasma membrane carbonic anhydrase is induced by salt in *Dunaliella salina*. J. Biol. Chem. 271, 17718–17723. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.30.17718>

Fisher, J. D., Fisher, W. A., Misovich, S. J., Kimble, D. L., & Malloy, T. E. (1996). Changing AIDS risk behavior: Effects of an intervention emphasizing AIDS risk reduction information, motivation, and behavioral skills in a college student population. Health Psychology, 15(2)

G

Garcia-Gonzalez, M., Moreno, J., Canavate, J. P, Anguis, V., Prieto, A., Manzano, C., Florencio, F. J, & Guerrero, M. G. 2003. Conditions for open-air outdoor culture of *Dunaliella salina* in southern Spain. Journal of Applied Phycology, 15(2-3), 177–184.

Guzmán H. S. M., de la Jara Valido A., de Assunção P. A. C. J., Presmanes K. F., Duarte L. C., Hahnefeld E. P. et Elkhati N. (2013). Developpment potentiel de nouvelles activités économiques associées à la biotechnologie aux Canaries et au Maroc. Daute Diseno (Ed), Spain. 71 p.

Gudin, C. (Dir.). (2013)., Histoire naturelle des microalgues. Odile Jacob. 2013,pp .194 .

Gonzalez, M. A., Gomez, P. I., & Polle, J. E. W. 2009. Taxonomy and phylogeny of the genus *Dunaliella*. In the book : The Alga *Dunaliella* - Biodiversity, Physiology, Genomics, and Biotechnology, 15–44.

Gómez, P. I., & González, M. A. (2005). The effect of temperature and irradiance on the growth and carotenogenic capacity of seven strains of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) cultivated under laboratory conditions. *Biological Research*, 38(2–3), 151–162. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602005000200005>

GonzálezRey, E., Anderson, P., González, M. A., Rico, L., Büscher, D., & Delgado, M. (2009). Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut*, 58(7), 929–939.

Gouveia, N., Rodriguez-Hernandez, J. L., & collaborateurs. (2024). Short-term associations between fine particulate air pollution and cardiovascular and respiratory mortality in 337 cities in Latin America. *Science of the Total Environment*,

Gouveia, N., Rodriguez-Hernandez, J. L., Kephart, J. L., Ortigoza, A., Morales Betancourt, R., Texcalac Sangrador, J. L., Rodriguez, D. A., Diez Roux, A. V., Sanchez, B., Yamada, G., & The SALURBAL Group. (2024). Short-term associations between fine particulate air pollution and cardiovascular and respiratory mortality in 337 cities in Latin America. *Science of The Total Environment*

Gouveia, N., Rodriguez-Hernandez, J. L., Kephart, J. L., Ortigoza, A., Morales Betancourt, R., Texcalac Sangrador, J. L., Rodriguez, D. A., Diez Roux, A. V., Sanchez, B., Yamada, G., & The SALURBAL Group. (2024). Short-term associations between fine particulate air pollution and cardiovascular and respiratory mortality in 337 cities in Latin America. *Science of The Total Environment*, 918, 171073.

H

Hosseini Tafreshi, A., & Shariati, M. 2009. *Dunaliella* biotechnology : methods and applications. *Journal of Applied Microbiology*, 107(1), 14–35.

Harvey, P. J., & Ben-Amotz, A. (2020). Towards a sustainable *Dunaliella salina* microalgal biorefinery for 9-cis β -carotene production. *Algal Research*, 50, 102002. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102002>

Harvey, P.J., & BenAmotz, A. (2020). Towards a sustainable *Dunaliella salina* microalgal biorefinery for 9cis β carotene production. *Algal Research*

J

JAUZEIN, C. Paramétrisation de la nutrition azotée et phosphorée d'*Alexandrium catenella* microalgue toxique responsable d'efflorescences dans la lagune de Thau, 2009.

Jacob-Lopes E., Maroneze M. M., Deprá M. C., Sartori R. B., Dias R. R. et Zepka L. Q. (2019). Bioactive food compounds from microalgae: an innovative framework on industrial biorefineries. *Current Opinion in Food Science*, 25: 1-7.

Jauzein, C. (2009). Paramétrisation de la nutrition azotée et phosphorée d'*Alexandrium catenella*, microalgue toxique responsable d'efflorescences dans la lagune de Thau (Thèse de doctorat, Université Montpellier II). Archives IFREMER; Université Montpellier II.

K

Krinsky, N.I., Johnson, E.J. 2005. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol. Aspects Med.*, 26(6): 459-516.

Katz, A., Waridel, P., Shevchenko, A., Pick, U. (2007). Salt-induced changes in the plasma membrane proteome of the halotolerant alga *Dunaliella salina* as revealed by blue native gel electrophoresis and nano-LC-MS/MS analysis. *Mol. Cell. Proteomics* 6, 1459–1472. doi: 10.1074/mcp.m700002-mcp200

Kadkhodaei, S., Abbasiliasi, S., Shun, T. J., Masoumi, H. R. F., Mohamed, M. S., Movahedi, A., Rahim, R., & Ariff, A. B. (2015). Enhancement of protein production by microalgae *Dunaliella salina* under mixotrophic

L

Le chevanton M., 2013. Interactions microalgues-bactéries en système expérimental bispécifique : effets sur la croissance de *dunaliella* sp. Thèse de doctorat. Université de Nantes. P38-39.

Lee Y-K (2001) Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. *Journal of Applied Phycology* 13:307–315

Lamers, P. P., van de Laak, C. C., Kaasenbrood, P. S., Lorier, J., Janssen, M., De Vos, R. C., & Wijffels, R. H. (2010). Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*. *Journal of Biotechnology*, 162(1), 21–27.

Lane, M., Van Wychen, S., Politis, A., & Laurens, L. M. L. (2021). A data-driven comparison of commercially available testing methods for algae characterization. *Algal Research*, 53, Article 102134.

Le Chevanton, M., Garnier, M., Bougaran, G., Schreiber, N., Lukomska, E., Bérard, J. B., Fouilland, E., Bernard, O., & Cadoret, J.-P. (2013). Screening and selection of growth-promoting bacteria for *Dunaliella* cultures. *Algal Research*,

Le Chevanton, M., Garnier, M., Bougaran, G., Schreiber, N., Lukomska, E., Bérard, J. B., Fouilland, E., Bernard, O., & Cadoret, J.P. (2013). Screening and selection of growthpromoting bacteria for *Dunaliella* cultures. *Algal Research*, 2(3), 212–222.

Liu, Y., & Cao, X. (2016). Characteristics and significance of the pre-metastatic niche. *Cancer Cell*, 30(5)

M

Monaco A. et Prouzet P. (2014). Valorisation et économie des ressources marines. Éditeur ISTE Editions (Ed) p. 403.

Morita M, Watanabe Y, Saiki H (2000) Investigation of photobioreactor design for enhancing the photosynthetic productivity of microalgae. *Biotechnology and Bioengineering* 69:693–698

MELANIE S. Opportunités de développement de la filière microalgues à l'île de la réunion ARER - Agence Régionale Energie Réunion - Association loi 1901 à but non lucratif Organisme de formation agréé Rapport de stage. , 2009.

Mata, T. M, Martins, A. A, & Caetano, N. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications : A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217–232.

Masojídek, J., Sergejevová, M., Malapascua, J.R., Kopecký, J., 2015. Thin-layer systems for mass cultivation of microalgae: flat panels and sloping cascades, in: Prokop, A., Bajpai, R.K., Zappi, M.E. (Eds.), *Algal Biorefineries*. Springer International Publishing, Cham, pp. 237–261.

Mishra, A., Mandoli, A., & Jha, B. 2008. Physiological characterization and stressinduced metabolic responses of *Dunaliella salina* isolated from salt pan. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35(10), 1093–1101.

Mobin, S., & Alam, F. (2017). Some Promising Microalgal Species for Commercial Applications: A review. *Energy Procedia*, 110, 510–517.
<https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.03.177>

Masojídek, J., Sergejevová, M., Malapascua, J. R., & Kopecký, J. (2015). Thin-layer systems for mass cultivation of microalgae: Flat panels and sloping cascades. In A. Prokop, R. K. Bajpai, & M. E. Zappi (Eds.), *Algal Biorefineries: Volume 2: Products and Refinery Design*

Mishra, A. & Jha, B. (2011). Antioxidant response of the microalga *Dunaliella salina* under salt stress. *Botanica Marina*, 54(2), 195–199.

Mishra, V. K., & Tripathi, B. D. (2008). Concurrent removal and accumulation of heavy metals by the three aquatic macrophytes. *Bioresource Technology*

Mobin, S. M. A., Chowdhury, H., & Alam, F. (2019). Commercially important bioproducts from microalgae and their current applications – A review. *Energy Procedia*, 160, 752–760.

Monaco, A., & Prouzet, P. (2014). *Vulnérabilité du système océanique*. Paris, France

N

Nehmé, L. (2017). Aramaic or Arabic? The Nabataeo-Arabic script and the language of the inscriptions written in this script. In L. Edzard (Ed.), *Arabic in context: Celebrating 400 years of Arabic at the University of Leiden* (pp. 47–93).

O

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979 Jun;**95(2):351-8**. doi: [10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3). PMID: **36810**.

Oren, A. 2005. Cent ans des recherches sur *Dunaliella salina*: 1905-2005. Biomedical central (The Open Access Publisher). Saline systems.

Oren A. Rodríguez-Valera F. 2001. The contribution of halophilic Bacteria to the red coloration of saltern crystallizer ponds. " *FEMS Microbiology Ecology*, 2001

Oren, A. 2005. Cent ans des recherches sur *Dunaliella salina*: 1905-2005. Biomedical central (The Open Access Publisher). Saline systems.

Oren, A. (2005). A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005. *Saline Systems*, 1(1), Article 2.

Oren, A., & RodríguezValera, F. (2001). The contribution of *Salinibacter* species to the red coloration of saltern crystallizer ponds. *FEMS Microbiology Ecology*, 36(2–3), 123–130

Oren, A., Arahal, D. R., Göker, M., Moore, E. R. B., Rosselló-Móra, R., & Sutcliffe, I. C. (2023). International Code of Nomenclature of Prokaryotes. Prokaryotic Code (2022 Revision). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*

P

Pruvost J., Cornet J. F., Borgne F. et Jenck J. (2011). Production industrielle de microalgues et cyanobactéries, Techniques de l'Ingénieur, rubrique Innovations (in200) : PP1– 17.

POLLE J., TRAN D., BEN-AMOTZ A., 2009-History, distribution and habitats of Algae of the genus *Dunaliella* TEODORESCO (Chlorophyceae). In: The Alga *Dunaliella*, Science Publishers. A. Ben-Amotz, J. E.W. Polle, D. V. Subba Rao, p1–15.

Pulz, O., & Gross, W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. Applied Microbiology and Biotechnology, 65(6), 635–648.

R

RICHMOND, A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology, 2004, p.1-588.

RICHMOND, A. Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors: an overview. Hydrobiologia 512: 2004, p.33-37.

Riyahi, J., Youssef Haouazine Rachida Akallal, Ahlam Mouradi, Anne Creach Thierry Givernaud, Aziza Mouradi. 2007. Influence des nitrates, de la salinité et du stress lumineux sur la teneur en acides gras et en β -carotène de *Dunaliella salina*. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 146 : 235-250.

Ramachandran, P., Pandey, N. K., Yadav, R. M., Suresh, P., Kumar, A., & Subramanyam, R. (2023). Photosynthetic efficiency and transcriptome analysis of *Dunaliella salina* under hypersaline conditions: a retrograde signaling mechanism in the chloroplast. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1192258. DOI : 10.3389/fpls.2023.1192258

Rabbani, S., Beyer, P., Lintig, J. V., Hugueney, P., & Kleinig, H. (1998). Induced β -Carotene synthesis driven by triacylglycerol deposition in the unicellular alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiology*, 116(4), 1239–1248.

Rani, S., Chauhan, M., Kataria, A., & Khang, A. (2023). IoT Equipped Intelligent Distributed Framework for Smart Healthcare Systems. Dans V. Rishiwal, P. Kumar, & A. Tomar (Éds.), *Towards the Integration of IoT, Cloud and Big Data (Studies in Big Data*, vol. 137, pp. 97–114). Springer Nature.

Ribeiro-Barros, A. I., Pawlowski, K., Graça, I., Jorge, T. F., & António, C. (2022). Mechanisms of salt stress tolerance in *Casuarina*: A review of recent research. *Journal of Forest Research*, 27(6), 433–445

Rocklöv, J., Markandya, A., Dasandi, N., van Daalen, K. R., Tonne, C., Semenza, J. C., et al. (2024). The 2024 Europe report of the Lancet Countdown on health and climate change: Unprecedented warming demands unprecedented action. *The Lancet Public Health*,

S

Salomez M., 2009, opportunités de développement de la filière microalgues à l'île de la Réunion. P32.

Shen Y, Yuan W, Pei ZJ, Wu Q, Mao E (2009) Microalgae mass production methods. *American Society of Agricultural Engineers* 52:1275–1287

Schlupalius, L. 1991. The extensive commercial cultivation of *Dunaliella-salina*. *Bioresource Technology*, 38(2-3), 241–243.

Subba Rao DV (2009) Cultivation, growth media, division rate and applications of *Dunaliella* species. In: *The Alga Dunaliella*, Science Publishers. A. Ben-Amotz, J. E.W. Polle, D. V. Subba Rao, p 1–15

Sathasivam R., Radhakrishnan R., Hashem A. et Abd Allah E. F. (2017). Microalgae metabolites: a rich source for food and medicine. *Saudi Journal of Biological Sciences*: (in press).

Shah, M. R., Lutz, G. A., Alam, A., Sarker, P., Kabir Chowdhury, M. A., Parsaeimehr, A., Liang, Y., & Daroch, M. (2018). Microalgae in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry. *Journal of Applied Phycology*, 30(1), 197–213. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1234-z>

Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265–278

Sakhawat, A., Khan, M. U., Rehman, R., Khan, S., Shan, M. A., Batool, A., Javed, M. A., & Ali, Q. (2023). Natural compound targeting BDNF V66M variant: insights from in silico docking and molecular analysis.

Salomez, G., Dupont-Lucas, C., Colombel, J.-F., Turck, D., Gower-Rousseau, C., Salleron, J., Lerebours, É., Cortot, A., & Salomez, J.-L. (2009). The natural history of pediatric ulcerative colitis: a population-based cohort study. *Inflammatory Bowel Diseases*, 15(2), 240–246.

Salomez, J., & Hofman, G. (2009). Nitrogen nutrition effects on nitrate accumulation of soil-grown greenhouse butterhead lettuce. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 40(1–6), 620–632

Santos, A. C., Willumsen, J., Meheus, F., Ilbawi, A., & Bull, F. C. (2023). The cost of inaction on physical inactivity to public health-care systems: A population-attributable fraction analysis. *The Lancet Global Health*, 11(1), e32–e39

Shah, H., Bilodeau, M., Burak, K. W., Cooper, C., Klein, M., Ramji, A., Smyth, D., & Feld, J. J.; for the Canadian Association for the Study of the Liver. (2018). The management of chronic hepatitis C: 2018 guideline update from the Canadian Association for the Study of the Liver. *CMAJ*

Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., & Roessler, P. (2017). Physiological and biochemical responses of *Dunaliella salina* to salinity stress: A review.

T

Tebbani, S., Lopes, F., Filali, R., Dumur, D., & Pareau, D. (2014). Bioprocess modeling. *CO2 Biofixation by Microalgae: Modeling, Estimation and Control*, 33-63.

TEODORESCO C., 1905- Organisation et développement du *Dunaliella*, nouveau genre de Volvocaceae-Polyblepharideae, *Beih Bot Zentralblatt*, vol 18:215–232.

Tammam, A. A., Fakhry, E. M., & ElSheekh, M. (2011). Effect of salt stress on antioxidant system and the metabolism of the reactive oxygen species in *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta*. *African Journal of Biotechnology*, 10(19)

Tebbani, S., Lopes, F. A. C., Filali, R., Dumur, D., & Estève, G. (2014). Nonlinear predictive control for maximization of CO₂ bio-fixation by microalgae in a photobioreactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(1), 83–97

V

Vonshak A, Torzillo G (2004) Environmental stress physiology. In: Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology, Blackwell Publishing Ltd. Amos Richmond

van Wijk, K. J., & Kessler, F. (2017). Plastoglobuli: Plastid microcompartments with integrated functions in metabolism, plastid developmental transitions, and environmental adaptation. *Annual Review of Plant Biology*, 68, 253–28

W

Wang, J., Wang, W., Li, R., Li, Y., Tian, G., Goodman, L., ... & Yang, H. (2008). The diploid genome sequence of an Asian individual. *Nature*, 456(7218), 60–65.

X

Xu, P., Shao, W., Zhang, K., Gao, P., Liu, S., Lei, M., Meng, F., Huang, S., Qiao, Y., & Luo, P. (2024). LVLMeHub: A comprehensive evaluation benchmark for large visionlanguage models. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*

Y

YAICHE ACHOUR H.*, SAADI S. A., DOUMANDJI A., ATTAL F.-S., BOURAS N., ZITOUNI A. Algerian journal of arid environment 42 vol. 11, n°1, Juin 2021: 42-53 INFLUENCE DES MÉTHODES DE RÉCOLTE DE LA MICROALGUE *Dunaliella salina* DUNADZI SUR QUELQUES PARAMÈTRES NUTRITIONNELS 2021

Z

Zhou, Y., Zhang, Y., Lian, X., Li, F., Wang, C., Zhu, F., Qiu, Y., Chen, Y., & Tan, Y. (2022). Therapeutic target database update 2022: Facilitating drug discovery with enriched comparative data of targeted agents. *Nucleic Acids Research*, 50(D1)

Zhu, D., Ma, J., Li, G., Rillig, M. C., & Zhu, Y.-G. (2022). Soil plastispheres as hotspots of antibiotic resistance genes and potential pathogens. *The ISME Journal*,

Annexes

ANNEXE 1 : Matériel non biologique :



PH-mètre



Microscope optique a caméra



Spectrophotomètre UV-Visible



Etuve



Centrifiguese



Bain-marie



Autoclave



Balance



Agitateur magnétique



Centrifugeuse pour eppendorfs



Vortex

ANNEXE 2**Tableau 1 . Composition chimique de Milieu Johnson Modifié (J/l) (Borowitzka,, 1988).**

To 980 ml of distilled water add :	
NaCl	Selon la salinité voulue (58.44 g)
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1.5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
KCl	0.2 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.2 g
KNO ₃	1.0 g
NaHCO ₃	0.043 g
KH ₂ PO ₄	0.035 g
Fe-solution	10 ml
Trace-élément solution	10 ml
Na ₂ EDTA	189 mg
FeCl ₃ ·6H ₂ O	244 mg
H ₃ BO ₃	61.0 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	38.0 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	6.0 mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	5.1 mg
ZnCl ₂	4.1 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	4.1 mg
Ajuster le PH a 7.5 avec du HCL	

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة البليدة 1
Université Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologie et Agro-Ecologie

Laboratoire des Sciences Animales & Recherche en Biobanking
Laboratoire de Biotechnologie de Productions Végétales

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme d'un Master Académique

Option

Biotechnologie et Pathologie Moléculaire

Thème

OPTIMISATION DE LA CULTURE DES MICROALGUES

Présenté par

M^{elle} KHOUNI Warda

M^{elle} MAHROUK Sara

Devant le Jury :

Mr. BOUKHATEM MN

Professeur

SNV, Blida1

Président

Mme. ROUAKI F

Maitre de conférences A

SNV, Blida1

Examinatrice

Mme. RAHIMI

Maitre de conférences A

SNV, Blida1

Promotrice

Session 2024 / 2025