

UNIVERSITE DE BLIDA 1

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DES BIOTECHNOLOGIES

THESE DE DOCTORAT LMD

Spécialité: Biotechnologie Végétale et Agro-alimentaire

**OPTIMISATION DES CONDITIONS DE CULTURE
DE LA MICRO-ALGUE *Dunaliella* AUTOCHTONE ISOLEE ET SA
CARACTERISATION NUTRITIONNELLE ET BIOLOGIQUE**

Par

Hafsa YAICHE ACHOUR

Devant le jury composé de:

A. HADJ ZIANE	Professeur,	U. de Blida 1	Présidente
L. LAMARI	Professeur,	ENS, Kouba., Alger	Examinatrice
A. AOUICHE	MCA,	ESSAIA., Alger	Examineur
S. MEGATLI	MCA,	U. de Blida 1	Examineur
A. DOUMANDJI	Professeur,	U. de Blida 1	Directrice de thèse

Blida, Juillet 2019

REMERCIEMENTS

Le présent travail a été réalisé en partie au laboratoire de l'Institut Technique des Élevages (ITELV) de Baba Ali, au Laboratoire du Centre National de Recherche et de Développement de la pêche et de l'Aquaculture (CNRDPA, à Bousmail) et au Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'École Normale Supérieure (ENS, Kouba). La partie de l'identification moléculaire a été effectuée au Laboratoire de l'Institut Technologique de la Grande Canarie (ITC) en Espagne. La partie extraction des pigments caroténoïdes a été réalisée en collaboration avec le groupe « Healthy lipids group » à l'Université Autonome de Madrid.

Je tiens tout d'abord à exprimer mes vifs remerciements à ma Directrice de thèse Madame DOUMANDJI Amel, Professeur à l'Université de Blida 1. Merci pour votre sympathie, votre soutien et vos encouragements. Merci, de m'avoir motivé et aidé jusqu'au dernier moment. Je vous exprime ici toute ma reconnaissance.

Mes remerciements les plus vifs sont adressés à Monsieur SABAOU Nasseridine, Professeur à l'École Normale Supérieure (ENS) de Kouba, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire LBSM. Merci d'avoir guidé constamment ce travail, merci de ne jamais hésité à me consacrer du temps pour discuter de mon travail, pour m'orienter, ainsi pour me conseiller. Vos qualités humaines et compétences scientifiques sont un exemple pour moi et pour tous les membres du laboratoire LBSM. Vous trouvez ici mes profonds respects et ma profonde gratitude. Que Dieu vous bénisse et vous garde en bonne santé.

Je remercie vivement les membres du jury de ma thèse d'avoir accepté de juger mon travail.

Un grand merci à Madame HADJ ZIANE Amel, Professeur à l'université de Blida 1, d'avoir accepté et me fait l'honneur de présider mon jury de thèse.

Mes remerciements s'adressent également à Madame LAMARI Lynda, Professeur à l'ENS de Kouba, je suis très reconnaissante d'avoir accepté de juger mon travail.

Mon profond respect et ma sincère gratitude à Monsieur ZITOUNI Abdelghani, Professeur à l'ENS de Kouba, vous me faites l'honneur d'être membre de mon jury de thèse, un grand merci à vous.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur MEGATLI Smail, Maître de Conférences A à l'Université de Blida 1. Merci d'avoir accepté d'en être un membre de mon jury de thèse.

J'exprime mes plus vifs remerciements à Monsieur AOUICHE Adel, Maître de Conférences A à l'École Supérieure des Sciences de l'Aliment et des Industries Agroalimentaires (ESSAIA) d'El Harrach. Vous me faites l'honneur d'être membre de mon jury de thèse.

Je remercie vivement Madame ASSUNÇÃO Patricia, Docteur au laboratoire de l'ITC (Grande Canarie, Espagne), de m'avoir accueillie au sein du laboratoire, de m'avoir initié à l'identification moléculaire. Merci pour votre aide précieuse, pour votre modestie et vos qualités humaines. Qu'elle trouve ici mes sincères respects.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur SEÑORÁNS Javier, Professeur à l'Université Autonome de Madrid, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Merci d'avoir mis à ma disposition tous les moyens et de me laisser travailler librement. Qu'il trouve ici ma profonde gratitude.

Mon profond respect à Monsieur BOURAS Nouredine, Professeur à l'Université de Ghardaïa et à Monsieur BADJI Boubeker, Professeur à l'ENS de Kouba, pour le temps qu'on m'a accordé, ainsi pour l'aide précieuse.

Je voudrais remercier également Monsieur EL ARROUSSI Hicham, Docteur à Moroccan Foundation for Advanced Science, Innovation & Research (MAScIR) et Madame KORD Afaf, Chercheur au CNRDPA, pour leur aide précieuse.

Je voudrais aussi remercier sincèrement SAADI Sid Ahmed, membre du Laboratoire LBSM et future Docteur, pour son aide précieuse et pour m'avoir épaulé moralement durant toutes mes années de thèse.

Je tiens également à remercier Monsieur RAMDAN Sidaali, Maître de conférences à l'université de Blida 1. Vous trouvez ici mes sincères respects.

J'exprime chaleureusement ma profonde gratitude à tous le personnel du Laboratoire Centrale de l'ITELV, pour leur sympathie et leur disponibilité: Soumia, Abir, Djinane, Yasmine, Hafsa, Meriem et Samia.

J'adresse mes remerciements à tous les membres du Laboratoire LBSM, sans oublié l'ingénieur du laboratoire Madame KACI Sonia.

Mes remerciements vont aussi au membre du groupe Healthy lipids de l'université autonome de Madrid: Maria, Natalia. Un grand merci à la gentille fille Cristina pour sa simplicité, son bon humeur et surtout pour le temps qu'elle m'a attribué. Merci à vous tous.

YAICHE ACHOUR Hafsa

DEDICACE

À mes très chers parents, *vous étiez toujours présents durant toutes mes études supérieures et sans vous ce travail n'aurait pas vu le jour. Je vous remercie pour votre patience, votre soutien et vos encouragements. Merci de m'avoir soutenu jusqu'au dernier moment. Que Dieu vous garde pour nous et vous préserve votre santé.*

À mes chers frères, sœur et belles sœurs.

À mes neveux *Faouzi et Mohamed Ayoub*

À mes nièces *Nouha et Bouchra*

« À tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail »

YAICHE ACHOUR *Hafsa*

RESUME

Ce travail a pour objectif l'isolement à partir de quelques sebkhas algériennes de souches de micro-algues appartenant au genre *Dunaliella*, l'identification de ces souches, la détermination des conditions qui permettent une meilleure production des pigments caroténoïdes de la souche *D. salina* DunaDZ1 et la sélection des conditions d'extraction qui aboutissent à un meilleur rendement en ces pigments, notamment le β -carotène.

La recherche des souches de *Dunaliella* a été menée dans les eaux prélevées à partir de quatre sebkhas algériennes. Vingt six souches ont ainsi été isolées. Leur identification, réalisée sur la base d'une étude morphologique, une étude moléculaire et un test de caroténogenèse, a permis de rattacher 17 souches à l'espèce *D. salina*, 1 souche à *D. parva* et 6 souches à *D. viridis*. Deux autres souches appartiennent à d'autres genres, l'un étant *Tetraselmis* et l'autre, probablement un nouveau genre.

La suite des travaux a été concentrée sur la souche *D. salina* DunaDZ1 productrice de pigments caroténoïdes. Afin de déterminer les conditions de culture qui aboutissent à une meilleure production de ces pigments, différents stress ont été appliqués sur deux milieux de culture, Johnson et f/2, en adoptant la méthode de culture dite en «deux phases». Les résultats du test de caroténogenèse ont permis de constater que le stress salin est celui qui a abouti à la teneur la plus élevée en pigments caroténoïdes (23,69 pg/cellule) et ce, dans le milieu f/2.

L'efficacité de deux méthodes de récolte de la biomasse, la centrifugation et la floculation à différents pH, a été évaluée. La méthode de récolte par centrifugation a été retenue car elle n'affecte pas la qualité nutritionnelle de la biomasse, contrairement à la floculation qui a affecté cette qualité, notamment celle des protéines et de certains acides gras insaturés. L'extraction des pigments caroténoïdes à partir des biomasses «verte» et «orange» de la souche *Dunaliella salina* DunaDZ1 a été réalisée par deux techniques, la méthode d'extraction assistée par ultrasons (UAE) et la méthode d'extraction par liquides pressurisés (PLE). Les extraits obtenus ont été caractérisés par HPLC-DAD. Les techniques PLE et UAE ont montré que le β -carotène est le pigment majoritaire dans la biomasse orange, et la lutéine dans la biomasse verte. Le dosage par HPLC des extraits obtenus a montré que la méthode PLE a donné un meilleur rendement en pigments caroténoïdes, notamment le β -carotène (isomères *cis* et *trans*) comparativement à la méthode UAE. Le meilleur solvant ayant abouti à un meilleur rendement de ces deux isomères dans la biomasse orange est le *n*-hexane (138,54 et 357,10 mg/g d'extrait sec, pour les isomères *cis* et *trans*, respectivement).

Les activités antioxydantes et antimicrobiennes de tous les extraits ont aussi été entreprises. Une meilleure activité antioxydante a été trouvée dans l'extrait à l'acétate d'éthyle à partir de la biomasse orange en utilisant la méthode PLE, tandis qu'une meilleure activité antimicrobienne a été obtenue à partir de l'extrait éthanolique de la biomasse verte.

Mots clés: *Dunaliella salina*, pigments caroténoïdes, extraction, β -carotène, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

ABSTRACT

The aim of this study is the isolation and the identification of microalgae belonging to the genus *Dunaliella* from some Algerian slate lakes. The conditions which lead to the best amount of carotenoids from the strain *Dunaliella salina* DunaDZ1 were also investigated, as well as extraction conditions to achieve the best carotenoids yield, especially β -carotene.

Dunaliella strains were investigated in water sampled from four Algerian salt lakes. Twenty six strains were isolated. Strains identification based on morphological, molecular characterization and carotenogenesis test revealed that 17 strains belonged to the species *D. salina*, one strain to *D. parva* and six strains to *D. viridis*. The two others strains were attached to other genera, one to *Tetraselmis* and the other probably to a new genus.

The following work was focused on the carotenogenic strain *D. salina* DunaDZ1. In order to determine the best conditions which lead to the highest production of carotenoids, different stress were applied using two culture media, Johnson and f/2, and using two-stages culture method. The results of the carotenogenesis test showed that salt stress was the one that lead to the highest content of carotenoid pigments (23.69 pg/cell) in the f/2 medium. The efficiency of two biomass harvesting methods, centrifugation and flocculation at different pH, was investigated. Biomass harvesting method by centrifugation was retained since it does not impact on the biomass nutritional quality, unlike flocculation that affected this quality, especially proteins and some unsaturated fatty acids. Carotenoids extraction from the «green» and «orange» biomass of *D. salina* DunaDZ1 strain were conducted using two methods, ultrasounds assisted extraction (UAE) and pressurized liquids extraction (PLE). Extracts characterization was done by using HPLC-DAD.

The two extracting methods PLE and UAE, have shown that β -carotene is the main carotenoids in the orange biomass, and luteine in the green biomass. HPLC characterization showed that better carotenoids yields are obtained by the PLE method in comparison to UAE method, especially β -carotene (isomers *cis* and *trans*). Otherwise, *n*-hexane gave the best yield of β -carotene isomers from the orange biomass (138.54 and 357.10 mg/g of dry extract, for *cis* and *trans* isomers, respectively).

The antioxidant and antimicrobial activities were also estimated for all the obtained extracts. PLE ethyl acetate extract from the orange biomass showed the highest antioxidant activity. Otherwise, the better antimicrobial activity was obtained from the ethanolic extract of the green biomass.

Key words: *Dunaliella salina*, carotenoid pigments, extraction, β -carotene, antioxidant activity, antimicrobial activity.

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى عزل وتصنيف سلالات من جنس *Dunaliella* (طحالب مجهرية) وتحديد العوامل المؤدية إلى إنتاج أمثل للكاروتينويدات *Caroténoïdes* عند السلالة *D. salina* DunaDZ1 واستخلاص هاته الصبغات، خاصة β -كروتين. عزلنا ستة وعشرون سلالة من جنس *Dunaliella* إنطلاقاً من مياه مستخرجة من أربعة سبخات جزائرية. أظهرت نتائج تصنيفها بالدراسات الميكرومورفولوجية والبيوجزيئية وكذلك القدرة على إنتاج الكاروتينويدات *caroténoïdes*، إنتساب 17 سلالة إلى النوع *D. salina* ، 6 سلالات إلى النوع *viridis* *D.* وسلالة واحدة إلى النوع *D. parva* وإنتماء سلالتين إلى أجناس أخرى (واحدة إلى جنس *Tetraselmis*، والآخرى إلى جنس يحتمل أن يكون جديداً). ركّزنا كل أعمالنا على السلالة *D. salina* DunaDZ1 التي تتمتع بخاصية إنتاج الكاروتينويدات. إستعملنا لانتقاء شروط الزرع المؤدية إلى أحسن إنتاج من الكاروتينويدات، عدّة عوامل ضغط في الوسطين الغذائيين (Johnson و $f/2$)، بلعتماد طريقة الزرع على مرحلتين. أدى تحليل الكاروتينويدات إلى تحديد الضغط الملحي كأحسن عامل مؤدي إلى أعلى كمية من هاته الصبغات (23,69 بيكوغرام/خلية)، وهذا باعتماد الوسط الغذائي $f/2$. إستعملنا كذلك طريقتين لجمع الكتلة الحيوية: بالطرد المركزي *centrifugation* وبالتنديف *floculation* مطبقة في قيم مختلفة من الـ pH. بيّنت النتائج أن الكتلة الحيوية تجمع أحسن بطريقة الطرد المركزي وذلك لعدم مساسها بالجودة الغذائية للكتلة، مقارنة مع طريقة التنديف التي تمس إلى حد كبير بهذه الجودة، خاصة البروتينات والأحماض الدهنية غير المشبعة. استخلصنا الكاروتينويدات من الكتلة الحيوية الخضراء والبرتقالية للسلالة *Dunaliella salina* DunaDZ1 بطريقتين: بواسطة الموجات فوق الصوتية (UAE) وبواسطة السوائل المضغوطة (PLE). حللنا المستخلصات بالكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) فظهر في كلا الطريقتين أن الـ β -كروتين هي الصبغة الغالبة في الكتلة الحيوية البرتقالية واللوتين *lutéine* في الكتلة الحيوية الخضراء. كما أظهر فحص HPLC للمستخلصات أن طريقة PLE أعطت كميات أفضل من الكاروتينويدات خاصة الـ β -كروتين (الإزوميرات *cis* و *trans*) مقارنة بطريقة UAE. أما المذيب الذي أدى إلى أفضل كمية من الـ β -كروتين (الإزوميرات *cis* و *trans*) للكتلة البرتقالية فهو الهيكسان *n-hexane* (138,54 و 357,10 مغ/غ من المستخلص الجاف، للإزوميرات *cis* و *trans*، على التوالي). بينت نتائج تحاليل القدرة المضادة للأكسدة ونشاط المضادات للميكروبات لكل المستخلصات المتحصل عليها أن أفضل نشاط مضاد للأكسدة كُشف عنه في مستخلص أسيتات الإيثيل *Acétate d'éthyle* من الكتلة الحيوية البرتقالية بطريقة PLE. أما بالنسبة لأحسن نشاط مضاد للميكروبات فكشف في المستخلص الإيثانولي للكتلة الحيوية الخضراء.

الكلمات المفتاحية: *Dunaliella salina*، كاروتينويدات، إستخلاص، الـ β -كروتين، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للميكروبات.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS

RESUMES

TABLE DES MATIERES

LISTES DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

INTRODUCTION GENERALE..... 1

CHAPITRE I: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LES MICRO-ALGUES	4
I.1. Définition, classification et caractéristiques des micro-algues.....	4
I.1.1. Définition et principales caractéristiques des micro-algues.....	4
I.1.2. Classification et distribution des micro-algues.....	5
I.2. Modes et Systèmes de culture des micro-algues.....	6
I.2.1. Modes de culture des micro-algues.....	6
I.2.1.1. Mode discontinu ou dit en <i>batch</i>	6
I.2.1.2. Mode semi-continu ou dit <i>fed-batch</i>	8
I.2.1.3. Mode continu.....	8
I.2.2. Systèmes de culture à grande échelle des micro-algues.....	9
I.2.2.1. Culture en milieu ouvert ou raceway	9
I.2.2.2. Culture en milieu fermé ou photobioréacteur.....	10
I.3. Besoins fondamentaux et physiologie des micro-algues.....	12
I.4. Techniques de récoltes des micro-algues.....	13
I.4.1. Flocculation.....	13
I.4.2. Centrifugation et flottation.....	14
I.4.3. Filtration.....	15
I.5. Importance et applications biotechnologiques des micro-algues.....	15
I.5.1. Nutrition humaine et industries agro-alimentaire.....	17
I.5.2. Industries pharmaceutiques.....	18
I.5.3. Domaine cosmétique.....	20
I.5.4. Domaine énergétique.....	20
II. LA MICRO-ALGUE <i>Dunaliella</i>	21
II.1. Historique, taxonomie, distribution et habitat des micro-algues du genre <i>Dunaliella</i>	21

II.2. Taxonomie du genre <i>Dunaliella</i>	21
II.3. Morphologie et structure de <i>Dunaliella</i>	24
II.4. Cycle de vie et reproduction chez le genre <i>Dunaliella</i>	26
II.4.1. Reproduction asexuée «végétative».....	26
II.4.2. Reproduction sexuée.....	26
II.5. Physiologie de <i>Dunaliella salina</i> et mécanisme du stress.....	28
II.6. Voie de synthèse des pigments caroténoïdes de <i>D. salina</i>	29
II.7. Valorisation du β -carotène produits par <i>D. salina</i>	30
III. PIGMENTS CAROTENOÏDES ET TECHNIQUES D'EXTRACTIONS	32
III.1. Caractéristiques chimiques et classification des pigments caroténoïdes.....	32
III.2. Propriétés biologique des pigments caroténoïdes.....	35
III.3. Techniques d'extractions des pigments caroténoïdes.....	35
III.3.1. Extraction conventionnelle.....	35
III.3.2. Extraction assistée par ultrasons.....	36
III.3.3. Extraction par liquides pressurisés « PLE ».....	37
III.3.4. Extraction par fluide supercritique.....	39

CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

I. DESCRIPTION DES SITES D'ETUDE ET ECHANTILLONNAGE	41
I.1. Sebkhas d'Oran et d'Arzew.....	41
I.2. Sebkhas de la région de Djelfa.....	42
I.2.1. Sebkha de Zahrez Chergui (Sidi Ameer).....	42
I.2.2. Sebkha de Zahrez Gherbi.....	43
II. ANALYSES PHYSICOCHIMIQUES DES EAUX	46
III. ISOLEMENT, PURIFICATION ET CONSERVATION DES SOUCHES DE <i>Dunaliella</i>	46
III.1. Isolement des souches de <i>Dunaliella</i>	46
III.2. Purification et conservation des souches de <i>Dunaliella</i>	48

IV. IDENTIFICATION DES SOUCHES DE <i>Dunaliella</i>	49
IV.1. Activation et adaptation des souches pour la culture en milieux liquides.....	49
IV.2. Etude morphologique des souches de <i>Dunaliella</i>	50
IV.3. Etude moléculaire des souches de <i>Dunaliella</i>	50
IV.3.1. Extraction de l'ADN.....	50
IV.3.2. Purification de l'ADN extrait.....	51
IV.3.3. Amplification de l'ADN par PCR.....	51
IV.3.4. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	53
IV.3.5. Séquençage.....	54
IV.3.6. Etudes phylogénétiques.....	54
IV.4. Test de carotenogénèse	55
IV.4.1. Conditions de culture des souches en phase de croissance	55
IV.4.2. Carotenogénèse et dosage des pigments caroténoïdes par HPLC	55
 V. CROISSANCE DES SOUCHES DE <i>Dunaliella</i> A DIFFERENTES CONCENTRATION DE NaCl	 57
V.1. Cinétique de croissance par comptage cellulaire.....	57
V.2. Evolution des pigments durant la croissance.....	58
 VI. PRODUCTION DE PIGMENTS CAROTENOIDES DANS DES CONDITIONS DE STRESS	 59
VI.1. Phase de croissance (phase verte).....	59
VI.2. Phase de stress (phase orange): stress dû à une déficience en nitrate, à un stress salin et à un stress dû au cumul des deux facteurs	59
 VII. INFLUENCE DES METHODES DE RECOLTE DE <i>Dunaliella salina</i> DUNADZ1 SUR QUELQUES PARAMETRES NUTRITIONNELS	 60
VII.1. Production de biomasse.....	60
VII.2. Récolte de biomasse.....	62
VII.2.1. Par centrifugation.....	62
VII.2.2. Par floculation.....	63
VII.2.3. Efficacité de récupération.....	63
VII.3. Analyses des protéines, des carbohydrates et des acides gras.....	63

VII.3.1. Protéines.....	63
VII.3.2. Carbohydrates.....	64
VII.3.3. Acides gras.....	65
VII.3.3.1. Extraction des lipides.....	65
VII.3.3.2. Transméthylation et analyse par chromatographie en phase gazeuse CPG.....	66
VIII. PROCÉDES D'EXTRACTION DES CAROTENOÏDES A PARTIR DE <i>D. salina</i> DUNADZ1.....	67
VIII.1. Extraction assistée par ultrasons (UAE).....	67
VIII.1.1. Principe.....	67
VIII.1.2. Mode opératoire.....	67
VIII.2. Extraction par liquide pressurisé (PLE).....	69
VIII.2.1. Principe.....	69
VIII.2.2. Mode opératoire.....	70
VIII.3. Caractérisation des extraits par des méthodes chromatographiques.....	71
VIII.3.1. Chromatographie sur couche mince (CCM) des extraits.....	71
VIII.3.2. Analyses chromatographiques des extraits par HPLC.....	72
VIII.4. Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité antioxydante des extraits.....	72
IX. ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DE LA SOUCHE DUNADZ1.....	74
IX.1. Souches microbiennes utilisées et milieu de culture.....	74
IX.2. Extraction et détermination de l'activité antimicrobienne.....	74
CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION	
I. CARACTERISTIQUES PHYSICOCHIMIQUES DES EAUX.....	76
II. SOUCHES DE <i>Dunaliella</i> ISOLEES.....	77
III. TAXONOMIE DES SOUCHES DE <i>Dunaliella</i>.....	78
III.1. Résultats.....	78
III.1.1. Caractéristiques morphologiques.....	78
III.1.1.1. Macromorphologie	78
III.1.1.2. Micromorphologie.....	79

III.1.2. Analyses phylogénétiques.....	83
III.1.2.1. Analyses phylogénétiques des souches DunaDZ1, DunaDZ2, DunaDZ3, DunaDZ4 et TC1.....	83
III.1.2.2. Analyses phylogénétique de toutes les souches isolées.....	86
III.1.3. Production de pigments caroténoïdes	90
III.1.3.1. Test de caroténogenèse.....	91
III.1.3.2. Quantification des pigments caroténoïdes de la souche DunaDZ1.....	92
III.2. Discussion.....	93
III.3. Conclusion.....	95
IV. CROISSANCE DE LA SOUCHE DUNADZ1 A DIFFERENTES CONCENTRATION DE NaCl ET PRODUCTION DE PIGMENT.....	96
IV.1. Résultats.....	96
IV.1.1 Cinétique de croissance par comptage cellulaire.....	96
IV.1.2. Quantification des pigments caroténoïdes et des pigments photosynthétiques.....	98
IV.2. Discussion.....	99
V. PRODUCTION DE CAROTENES EN PHASE DE STRESS.....	101
V.1. Résultats.....	101
V.1.1. Phase de croissance: accumulation de la biomasse.....	101
V.1.2. Phase de stress: production de carotènes.....	103
V.1.2.1. Caroténogenèse par absence de nitrate.....	105
V.1.2.2. Caroténogenèse par stress salin.....	105
V.1.2.3. Caroténogenèse par absence de nitrate combinée au stress salin.....	105
V.2. Discussion.....	106
VI. INFLUENCE DES METHODES DE RECOLTE DE LA BIOMASSE SUR LA QUALITE NUTRITIONNELLE DE <i>D. salina</i>.....	108
VI.1. Résultats.....	108
VI.1.1. Récolte de la biomasse de <i>D. salina</i> DunaDZ1 par centrifugation.....	108
VI.1.2. Récolte de la biomasse de <i>D. salina</i> DunaDZ1 par floculation.....	109
VI.1.3. Effet des méthodes de récolte sur la qualité nutritionnelle de la biomasse.....	110

VI.1.3.1. Effet sur la quantité de protéines et des carbohydrates.....	110
VI.1.3.2. Effet sur le profil des acides gras.....	111
VI.2. Discussion.....	112
VII. QUANTIFICATION DES PIGMENTS CAROTENOIDES APRES EXTRACTION ASSISTEE PAR ULTRASONNS ET PAR LIQUIDES PRESSURISES.....	115
VII.1. Résultats.....	115
VII.1.1. Rendements de l'extraction assistée par ultrasons (UAE).....	115
VII.1.2. Rendements de l'extraction par liquides pressurisés (PLE).....	116
VII.1.3. Caractérisation des extraits par CCM.....	117
VII.1.3.1. Extraits obtenus par la technique d'extraction assistée par ultrasons.....	117
VII.1.3.2. Extraits obtenus par la technique d'extraction par liquides pressurisés.....	119
VII.1.4. Caractérisation des extraits par HPLC-DAD.....	121
VII.1.4.1. Pigments caroténoïdes présents dans les extraits de la biomasse verte obtenus par la technique d'extraction assistée par ultrasons (UAE).....	122
VII.1.4.2. Pigments caroténoïdes présents dans les extraits de la biomasse orange obtenus par la technique d'extraction assistée par ultrasons.....	126
VII.1.4.3. Pigments caroténoïdes présents dans les extraits de la biomasse verte obtenus par la technique d'extraction par liquides pressurisés.....	129
VII.1.4.4. Pigments caroténoïdes présents dans les extraits de la biomasse orange obtenus par la technique d'extraction par liquides pressurisés.....	133
VII.1.5. Activité antioxydante.....	136
VII.2. Discussion.....	138
VIII. ACTIVITES ANTIMICROBIENNES DES EXTRAITS DE LA BIOMASSE DE <i>D. salina</i> DUNADZ1.....	143
VIII.1. Résultats.....	143
VIII.2. Discussion.....	145
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	147
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	

LISTE DES ABREVIATIONS

A	Absorbance	PCT	Pigments Caroténoïdes Totaux
ADN	Acide Désoxyribonucléique	PLE	Extraction par Liquide Préssurisé
AGMI	Acides Gras Monoinsaturés	PNI	Pigment Non Identifié
AGPI	Acides Gras Polyinsaturés	PSI	Livre-force par pouce carré
AGS	Acides Gras Saturés	rbcL	ribulose-bisphosphate carboxylase
aq	Aqueux	Rf	Rapport frontal
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique	rpm	Rotation par minute
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	TCA	Acide trichloroacétique
CCAP	Culture Collection d'Algues et des Protozoaires	Tris	Trishydroxyméthylaminométhane
CCM	Chromatographie sur Couche Mince	UAE	Extraction Assistée par Ultrasons
Chl a	Chlorophylle a	UTEX	Collection d'algue de l'université de Texas
Chl b	Chlorophylle b	UV	Ultra-Violet
CO₂	Dioxyde de carbone	v/v	volume/volume
CPG	Chromatographie en Phase Gazeuse		
dNTP	Désoxynucléoside Triphosphate		
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl		
E	Efficacité de récupération		
EDTA	Éthylènediaminetétraacétique		
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance		
IC₅₀	Concentration inhibitrice 50		
IPA	Institut Pasteur d'Algérie		
ISO	Organisation Internationale de Normalisation		
ITS	Internal Transcribed Spacer		
K	Kelvin		
mAU	Unité Milli-Absorbance		
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis		
MPa	Méga pascal		
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline		
MS	Matière Sèche		
NCBI	Centre National pour l'Information Biotechnologique		
NRRL	Laboratoire Régional de la Recherche, USA		
pb	Paire de base		
PCR	Réaction de Polymérisation en Chaîne		

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Courbe de croissance d'une culture de micro-algues en mode <i>batch</i>	7
Figure 1.2. Représentation schématique d'un système de culture des micro-algues en mode continu.....	9
Figure 1.3. Culture de <i>Dunaliella salina</i> en phase orange et phase verte dans le système raceway à double circuit. Usine de culture ITC (Institut Technologique de la Grande Canarie, Espagne).....	10
Figure 1.4. Photographie des différents types de photobioréacteurs.....	12
Figure 1.5. Valorisation biotechnologique des micro-algues dans différents domaines.....	16
Figure 1.6. Schéma des séquences d'ADN codant pour l'ARN ribosomique eucaryote	22
Figure 1.7. Arbre phylogénétique (neighbor-joining) basé sur l'analyse des séquences du gène codant pour la région ITS de quelques espèces du genre <i>Dunaliella</i> présentes dans la base de données NCBI.....	23
Figure 1.8. Photos microscopiques de différentes espèces de <i>Dunaliella</i>	24
Figure 1.9. Micrographie électronique (coupe longitudinale) de: cellule verte de <i>Dunaliella tertiolecta</i> et cellule stressée de couleur orange de <i>Dunaliella salina</i>	25
Figure 1.10. Représentation schématique des différents stades du cycle de vie de l'espèce <i>Dunaliella salina</i>	27
Figure 1.11. Voie de synthèse du β -carotène chez <i>D. salina</i>	30
Figure 1.12. Structures des principaux pigments caroténoïdes naturels.....	34
Figure 2.13. Sites de prélèvement au niveau des sebkhas d'Oran et d'Arzew.....	42
Figure 2.14. Situation géographique des sebkhas de Zahrez Chergui et Zahrez Gherbi.....	44
Figure 2.15. Sites d'échantillonnage au niveau de: Zahrez Chergui et Zahrez Gherbi.....	45
Figure 2.16. Conservation des souches de <i>Dunaliella</i> isolées.....	49
Figure 2.17. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	54
Figure 2.18. Culture de la souche <i>D. salina</i> DunaDZ1 à différentes concentrations de NaCl.....	57

Figure 2.19. Mise à l'échelle de la culture de la souche <i>D. salina</i> DunaDZ1.....	61
Figure 2.20. Illustration de la méthode d'extraction par ultrasons.....	68
Figure 2.21. Le système d'extraction par liquide pressurisé.....	70
Figure 2.22. Les extraits obtenus après une incubation à 45°C, pendant 24 h.....	75
Figure 3.23. Macromorphologie des souches ensemencées en stries.....	79
Figure 3.24. Micromorphologie des souches de micro-algues.....	82
Figure 3.25. Résultat de l'électrophorèse sur gel d'agarose des ADN extraits.....	83
Figure 3.26. Arbre phylogénétique (neighbor-joining) basé sur l'analyse des séquences de la région codant pour ITS et montrant la relation entre les souches DunaDZ1, DunaDZ2, DunaDZ3 et DunaDZ4 avec certaines souches appartenant au genre <i>Dunaliella</i> et présentes dans la base de données NCBI.....	85
Figure 3.27. Arbre phylogénétique (neighbor-joining) basé sur l'analyse des séquences du gène codant pour le <i>rbcl</i> et montrant la relation entre les souches DunaDZ1, DunaDZ2 et DunaDZ3 avec certaines souches appartenant au genre <i>Dunaliella</i> et présentes dans la base de données NCBI.....	86
Figure 3.28. Arbre phylogénétique (neighbor-joining) basé sur l'analyse des séquences du gène codant pour ITS de l'ensemble des souches et des micro-algues appartenant au genre <i>Dunaliella</i>	89
Figure 3.29. Arbre phylogénétique (neighbor-joining) basé sur l'analyse des séquences de la région codant pour l'ITS et montrant la relation entre la souche DunaDZ25 avec certaines souches appartenant au genre <i>Dunaliella</i> et au genre <i>Halosarcinochlamys</i> présentes dans la base de données NCBI.....	90
Figure 3.30. Culture des souches DunaDZ1 et DunaDZ4 durant le processus de caroténogénèse par absence de nitrate.....	91
Figure 3.31. Aspect morphologique des cellules de la souche <i>D. salina</i> DunaDZ1 avant et après le stress induit par l'élimination du nitrate du milieu de culture.....	92
Figure 3.32. Taux des pigments caroténoïdes exprimés en pourcentage dans la culture de la souche <i>D. salina</i> DunaDZ1 soumise au stress par déficience en nitrate.....	92
Figure 3.33. Cinétique de croissance de la souche DunaDZ1 à différentes concentrations de NaCl, dans le milieu de Semenenko-Abdullaev.....	97
Figure 3.34. Micromorphologie des cellules de la souche <i>D. salina</i> DunaDZ1 à différentes concentrations de NaCl.....	98

Figure 3.35. Evolution des pigments photosynthétiques et caroténoïdes en fonction de la salinité et du temps.....	99
Figure 3.36. Phase de croissance et production de chlorophylles <i>a</i> et <i>b</i> par la souche DunaDZ1.....	101
Figure 3.37. Production de pigments caroténoïdes par la souche <i>D. salina</i> DunaDZ1 durant la phase de croissance (sans stress).....	103
Figure 3.38. Evolution des pigments caroténoïdes totaux de la souche <i>D. salina</i> DunaDZ1 durant la phase de croissance (phase verte) et durant la phase de stress (phase orange).....	104
Figure 3.39. Efficacité de la récupération de la biomasse par centrifugation.....	109
Figure 3.40. Efficacité de floculation en fonction du pH et du temps de la biomasse verte de la souche <i>D. salina</i> DunaDZ1.....	110
Figure 3.41. Influence de la centrifugation et de la floculation sur la quantité de protéines et de carbohydrates de la souche DunaDZ1.....	111
Figure 3.42. Chromatographie sur couche mince des différents extraits obtenus par extraction assistée par ultrasons (UAE) à partir de la biomasse verte de la souche <i>D. salina</i> DunaDZ1.....	118
Figure 3.43. Chromatographie sur couche mince des différents extraits obtenus par extraction assistée par ultrasons à partir de la biomasse orange de la souche <i>D. salina</i> DunaDZ1.....	119
Figure 3.44. Chromatographie sur couche mince des différents extraits obtenus par extraction par liquide pressurisé à partir de la biomasse verte de la souche <i>D. salina</i> DunaDZ1.....	120
Figure 3.45. Chromatographie sur couche mince des différents extraits obtenus par extraction par liquide pressurisé à partir de la biomasse orange de la souche <i>D. salina</i> DunaDZ1.....	121
Figure 3.46. Profil du chromatogramme de l'extrait obtenu à l'acétate d'éthyle de la biomasse verte de la souche <i>D. salina</i> DunaDZ1 en utilisant la méthode d'extraction assistée par ultrasons.....	123
Figure 3.47. Spectre UV-visible des pigments caroténoïdes de la souche <i>D. salina</i> DunaDZ1 dissous dans le méthanol.....	124
Figure 3.48. Profil du chromatogramme de l'extrait isobutanolique de la biomasse orange de la souche <i>D. salina</i> DunaDZ1 en utilisant la méthode d'extraction assistée par ultrasons.....	128
Figure 3.49. Spectre UV-visible du <i>trans</i> , β -carotène et du <i>cis</i> , β -carotène de la souche <i>D. salina</i> DunaDZ1 dissous dans le méthanol.....	128

Figure 3.50. Profil du chromatogramme de l'extrait obtenu à l'acétate d'éthyle de la biomasse verte de la souche <i>D. salina</i> DunaDZ1 en utilisant la méthode d'extraction par liquides pressurisés.....	132
Figure 3.51. Profil du chromatogramme de l'extrait hexanique de la biomasse orange de la souche <i>D. salina</i> DunaDZ1 en utilisant la méthode d'extraction par liquides pressurisés.....	134
Figure 3.52. Activité antimicrobienne de différents extraits de la biomasse verte de la souche DunaDZ1.....	144

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1. Activité antimicrobienne des composés bioactifs extraits à partir de certaines espèces de micro-algues.....	19
Tableau 2.2. Composition des milieux de culture.....	47
Tableau 2.3. Noms, séquences et température d'hybridation des amorces utilisées pour l'identification de <i>Dunaliella</i>	52
Tableau 2.4. Composition du mélange réactionnel de la PCR.....	52
Tableau 2.5. Programme du thermocycleur pour la région ITS et les gènes 18S et rbcL.....	53
Tableau 2.6. Gradient de solvants utilisés pour l'analyse HPLC.....	56
Tableau 3.7. Caractéristiques physicochimiques des eaux des différentes sebkhas étudiées.....	77
Tableau 3.8. Souches de micro-algues isolées et leur origine.....	78
Tableau 3.9. Caractéristiques micromorphologiques des 5 souches représentatives des groupes: 1, 2, 3, 4 et 5.....	81
Tableau 3.10. Taille des séquences et pourcentages de similarité des 26 souches de micro-algues avec les espèces les plus proches qui se trouvent dans la base de données NCBI.....	88
Tableau 3.11. Quantités des pigments caroténoïdes, exprimées en µg/mL, dans la culture de la souche <i>D. salina</i> DunaDZ1 soumise au stress par déficience en nitrate.....	93
Tableau 3.12. Profil des acides gras de la biomasse verte de la souche <i>D. salina</i> DunaDZ1 récoltée par centrifugation et par floculation.....	112
Tableau 3.13. Rendements de l'extraction par UAE à partir des biomasses verte et orange de la souche DunaDZ1.....	115
Tableau 3.14. Rendements de l'extraction par PLE à partir des biomasses verte et orange de la souche DunaDZ1.....	116
Tableau 3.15. Composition en pigments caroténoïdes des extraits obtenus par UAE à partir de la biomasse verte de la souche <i>D. salina</i> DunaDZ1.....	125
Tableau 3.16. Composition en pigments caroténoïdes des extraits obtenus par UAE à partir de la biomasse orange de la souche <i>D. salina</i> DunaDZ1.....	127

Tableau 3.17. Composition en pigments caroténoïdes des extraits obtenus par PLE à partir de la biomasse verte de la souche <i>D. salina</i> DunaDZ1.....	131
Tableau 3.18. Composition en pigments caroténoïdes des extraits obtenus par PLE à partir de la biomasse orange de la souche de <i>D. salina</i> DunaDZ1.....	135
Tableau 3.19. Activité antioxydante des extraits obtenus par UAE à partir des biomasses verte et orange de la souche <i>D. salina</i> DunaDZ1.....	136
Tableau 3.20. Activité antioxydante des extraits obtenus par PLE à partir des biomasses verte et orange de la souche <i>D. salina</i> DunaDZ1.....	137
Tableau 3.21. Activité antimicrobienne de la biomasse verte de <i>D. salina</i> sur milieu solide (diamètre du disque 6 mm, compris).....	144

INTRODUCTION GENERALE

Les micro-algues sont des microorganismes eucaryotes, unicellulaires et photosynthétiques. Elles sont très diversifiées et sont représentées par plusieurs milliers d'espèces potentiellement utilisables dans divers domaines [1]. Elles sont retrouvées dans tous les habitats aquatiques, marins ou d'eaux douces [2]. Les micro-algues suscitent un intérêt croissant dans le monde. Leur diversité ouvre de nombreuses possibilités de valorisation. En revanche, il n'y a qu'une dizaine d'espèces de micro-algues qui sont cultivées à l'échelle industrielle, avec une prédominance de *Chlorella* et *Dunaliella*, ainsi que de la spiruline, cyanobactérie classée autrefois parmi les Cyanophyceae ou algues bleues [2].

Les micro-algues constituent un réservoir de bioressources avec des applications multiples, par exemple, comme compléments pour l'alimentation humaine, comme matière première pour la production de biofuel et en fournissant des molécules pour l'industrie pharmaceutique [3]. Les micro-algues contiennent de nombreux pigments tels que les chlorophylles et les pigments caroténoïdes qui sont souvent employés comme colorants naturels dans l'industrie alimentaire limitant ainsi l'utilisation des colorants artificiels [4].

Dunaliella salina est une micro-algue verte halophile, appartenant à l'ordre des Chlamydomonadales et à la famille des Dunaliellaceae. Elle est retrouvée dans plusieurs écosystèmes, principalement les eaux salines [5]. La principale caractéristique morphologique chez le genre *Dunaliella* est l'absence de paroi cellulaire. Cependant, les cellules sont entourées d'une enveloppe fine de nature glycoprotéique [6].

Dunaliella salina est considérée comme la source naturelle la plus riche en pigments caroténoïdes, notamment le β -carotène [7]. Dans des conditions de stress, *D. salina* produit des teneurs élevées en β -carotène, pouvant atteindre jusqu'à 10% de son poids sec [8]. Chez *D. salina*, différents facteurs de stress peuvent déclencher la caroténogénèse, tels qu'une forte salinité, une forte intensité lumineuse, une déficience en nutriments, etc. [9, 10, 11]. Cette espèce peut accumuler également d'autres pigments caroténoïdes ayant un potentiel

biotechnologique intéressant, notamment la lutéine, la violaxanthine, l'anthéroxanthine, la zéaxanthine, l' α -carotène et le lycopène [3, 12, 13, 14].

Grâce à la présence du β -carotène, *D. salina* possède d'importantes applications dans différentes industries. Le β -carotène est un puissant antiradicalaire et provitaminique. Il possède diverses vertus, telles que la diminution du risque de nombreuses affections chroniques, comme les maladies cardiovasculaires et la diminution de certains cancers [15, 16]. Les propriétés précieuses du β -carotène (physiques et biologiques) font de ce composé un additif alimentaire très recherché. Il est utilisé dans l'industrie alimentaire comme pigment et comme agent antioxydant dans de nombreux produits alimentaires [17].

En industrie agro-alimentaire, la demande en pigments naturels est en forte croissance, vu l'impact négatif des colorants artificiels sur la santé du consommateur. Plusieurs chercheurs ont étudié l'extraction des pigments à partir de différentes matrices naturelles, dont les micro-algues qui sont à cet effet de bonnes candidates. Les pigments caroténoïdes, notamment le β -carotène, sont parmi les molécules qui suscitent l'intérêt des chercheurs. Différentes techniques d'extractions ont été développées et testées afin d'avoir des rendements importants en ces pigments mais aussi de développer une technique économique qui n'affecte pas par la suite leur valorisation et leur application [18, 19, 20, 21].

En Algérie, les écosystèmes hypersalins, tels que les sebkhas, de l'arabe سبخة, pourraient être une source intéressante en micro-algues, notamment celles appartenant au genre *Dunaliella*, qui n'a jamais été étudié dans notre pays, et surtout l'espèce *D. salina* qui est halophile et productrice de pigments caroténoïdes. Ces milieux salins méritent de ce fait d'être valorisés.

La question que l'on peut se poser est la suivante:

Pourrait-on améliorer la production des pigments caroténoïdes (dont le β carotène) ainsi que le pouvoir antioxydant et le pouvoir antagoniste en utilisant différents milieux de culture et en appliquant différentes méthodes de stress et d'extraction, et ce, afin d'obtenir au moins une souche de *D. salina* prometteuse

autochtone isolée des écosystèmes hypersalins d'Algérie ayant un potentiel intéressant valorisable dans le domaine agro-alimentaire?.

C'est pour répondre à cette question que nous avons réalisé une étude qui a comme objectif l'isolement, à partir de quelques sebkhas algériennes, de souches de *Dunaliella salina* productrices de pigments caroténoïdes, et aussi la détermination des conditions qui aboutissent à une meilleure production et une meilleure extraction de ces pigments, notamment le β -carotène.

Le présent travail est subdivisé en plusieurs chapitres:

Le premier chapitre présente une revue bibliographique sur les micro-algues, spécialement *Dunaliella salina*, sur les principales techniques de culture et de récolte de ces micro-algues, leur application dans différents domaines et les différentes techniques d'extraction des pigments caroténoïdes.

Le deuxième chapitre est consacré à la méthodologie expérimentale suivie au cours de cette thèse, en présentant les méthodes d'isolement et d'identification des souches de *Dunaliella*, les méthodes de culture (phase de croissance et phase de stress), ainsi que les techniques de récoltes et d'analyses de la biomasse, l'extraction des pigments caroténoïdes, et les activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits.

Le troisième chapitre expose les résultats obtenus et leurs discussions. Une première partie est consacrée à l'isolement et la taxonomie des souches de *Dunaliella*, suivi par un test de caroténogénèse. Dans une deuxième partie, une cinétique de croissance a été menée.

Dans une troisième partie, l'étude de la caroténogénèse dans des conditions de stress a été réalisée sur une souche sélectionnée, *D. salina* DunaDZ1. La quatrième partie est consacrée à la mise à l'échelle de la culture de *D. salina* DunaDZ1 et à la détermination de la meilleure méthode de récolte de la biomasse. La cinquième partie est réservée à la sélection de la meilleure méthode et les meilleures conditions qui aboutissent à un rendement élevé en pigments caroténoïdes, et ce, à partir des biomasses verte et orange de la souche *D. salina* DunaDZ1.

Une conclusion générale et les perspectives terminent ce travail.

CHAPITRE I: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LES MICRO-ALGUES

I.1. Définition, classification et distribution des micro-algues

I.1.1. Définition et principales caractéristiques des micro-algues

Les micro-algues sont des microorganismes eucaryotes photosynthétiques qui se développent dans différents habitats, notamment les écosystèmes aquatiques. Les micro-algues sont capables de convertir l'énergie lumineuse et le CO₂ en un ensemble de matières organiques [22].

Leur existence remonte à plus de trois milliards d'années. Par leur activité photosynthétique, les micro-algues participent dans une large mesure à la fixation du CO₂, la régulation du flux de nutriments et la production de l'oxygène atmosphérique. Les micro-algues sont considérées comme les premiers producteurs d'oxygène [22]. Elles sont considérées comme des bioressources précieuses contenant différentes molécules intéressantes dont la plupart restent encore à être exploiter [23].

La majorité des micro-algues sont dites photoautotrophes ou autotrophes. Elles tirent leur énergie de la lumière par photosynthèse. Leur principale source nutritive est le CO₂ en solution dans l'eau. Certaines espèces de micro-algues peuvent accumuler, dans certaines conditions de culture, le carbone fixé, sous forme de lipides qui constituent pour elles une réserve de carbone. Dans les conditions normales, ces teneurs restent faibles et les lipides sont principalement constitués de phospholipides et de glycolipides (constituants des membranes) [24, 25].

En revanche, certaines espèces de micro-algues, dites hétérotrophes, sont capables de se développer en absence de lumière. Dans ce cas, elles se développent en mode fermé dans des bioréacteurs semblables à des fermenteurs et se nourrissent d'une source de carbone organique [26].

I.1.2. Classification et distribution des micro-algues

Les micro-algues sont des microorganismes très diversifiés. Environ 30 000 espèces ont déjà été caractérisées. Ce nombre représente moins de 10% du total existant estimé. Une dizaine d'espèces seulement sont exploitées au niveau industriel et commercial. Les scientifiques ont analysé les micro-algues pour les distinguer et les diviser en plusieurs classes selon des critères généraux comme la pigmentation, la structure biologique et le métabolisme [25]. On distingue les micro-algues eucaryotes qui sont répartis sur plusieurs classes taxonomiques (Chlorophyceae, Rhodophyceae, Phaeophyceae, Chrysophyceae, Euglenophyceae, Dinophyceae et Haptophyceae) et les cyanobactéries (procaryotes) qui sont encore à ce jour, étudiées par les spécialistes en algologie sous la dénomination de micro-algues bleues ou Cyanophyceae [27, 28].

Les micro-algues eucaryotes possèdent une structure cellulaire végétale classique, compartimentée, avec ou sans paroi cellulosique et avec des pigments photosynthétiques renfermés dans les chloroplastes. En revanche, les cyanobactéries ont une structure typiquement procaryote, sans compartiment, avec des pigments photosynthétiques contenus dans des membranes lamellaires [29].

Les micro-algues sont aptes à coloniser tous les milieux. Elles sont présentes dans les eaux douces et salées, les eaux thermales, les eaux glacées, les eaux acides ou encore les eaux hypersalées. Elles peuvent être présentes dans les sols. Certaines sont capables de se développer sur des rochers humides, sur les murs, sur les troncs d'arbres ou encore sur d'autres surfaces immergées, comme les coques des bateaux, formant ce qu'on appelle le biofouling [30]. Certaines espèces peuvent supporter des températures très faibles ou paradoxalement très élevées. Cette faculté d'adaptation est le résultat de leurs propriétés morphologiques ainsi que leur capacité à synthétiser différents métabolites secondaires [22].

I.2. Systèmes et modes de culture des micro-algues

La production des micro-algues est en forte augmentation à travers le monde. Elle était estimée, en 2004, entre 7 000 et 10 000 tonnes par an. Durant cette année, il y avait 276 entreprises référencées dans le domaine de la production des micro-algues, dont le tiers produisaient essentiellement les trois espèces dominantes: *Spirulina* (cyanobactérie), *Chlorella* et *Dunaliella*. Plus récemment, avec seulement quelques dizaines d'espèces de micro-algues cultivées, la production mondiale maximale est de 10 000 tonnes par an. Cette valeur reste négligeable comparativement à celle de la production mondiale des macroalgues (15 millions de tonnes) [31].

I.2.1. Modes de culture des micro-algues

La culture des micro-algues est similaire à celle des autres microorganismes, tels que les bactéries. La particularité dans ce cas réside dans l'activité photosynthétique et donc l'apport nécessaire d'une énergie lumineuse suffisante. Il existe principalement trois modes de production: discontinu ou dit *batch*, semi-continu et continu. Dans le cas du mode discontinu, les éléments nutritifs ne sont fournis qu'au démarrage de la production et la récolte s'effectue au terme de la culture. En revanche, le mode semi-continu permet une récolte partielle de la biomasse à intervalles réguliers et une réalimentation du milieu en nutriments. Le mode continu permet de récolter en permanence la biomasse, le renouvellement du milieu étant assuré en continu [32].

I.2.1.1. Mode discontinu ou dit *batch*

La culture en *batch* est un mode de culture très utilisé pour sa simplicité de mise en œuvre et son faible coût en matériel et en maintenance [33]. C'est un système fermé pour lequel est introduit en une seule fois, en début de culture, l'inoculum contenant les cellules des micro-algues ainsi que tous les éléments nutritifs nécessaires à la croissance. Il n'existe aucun échange d'éléments nutritifs ni de biomasse avec l'environnement extérieur pendant la culture. La concentration cellulaire augmente en fonction du temps jusqu'à épuisement du substrat limitant. Ce type de culture est généralement adapté aux applications

sous des conditions axéniques, mais ne permet pas une prise régulière des mesures. Pour une culture en mode *batch*, la croissance des micro-algues suit une allure sigmoïde traduisant quatre phases principales (figure 1.1) [22]:

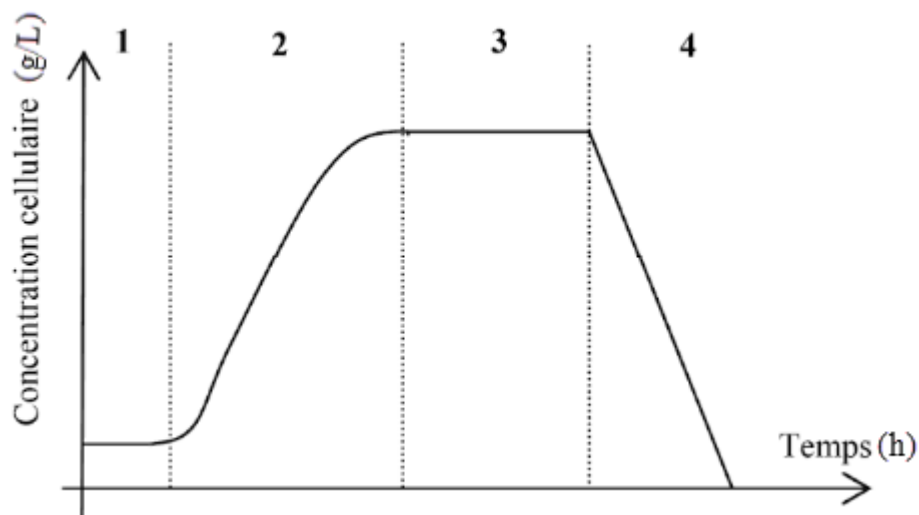


Figure 1.1: Courbe de croissance d'une culture de micro-algues en mode *batch*. **(1)** phase de latence, **(2)** phase exponentielle, **(3)** phase stationnaire et **(4)** phase de déclin [34].

Note: le début et la fin de la phase exponentielle peuvent aussi être appelés respectivement phase d'accélération et phase de ralentissement.

- Phase de latence: correspond à l'adaptation cellulaire aux nouvelles conditions environnementales. La vitesse de croissance est nulle et la durée de cette phase dépend essentiellement de l'inoculum, du milieu de culture et de la capacité d'adaptation de l'espèce cultivée aux nouvelles conditions de culture. Au cours de cette phase, qui dure de quelques heures à plusieurs dizaines d'heures, le taux de croissance est nul.
- Phase exponentielle (ou logarithmique): les cellules se multiplient jusqu'à atteindre leur taux de croissance maximal, les facteurs de croissance n'étant pas limitant à ce stade.
- Phase stationnaire: cette phase intervient lorsque le substrat limitant s'épuise. L'apport de lumière peut aussi être insuffisant, en raison d'une concentration cellulaire élevée et en raison de la formation de biofilm sur les

parois du photobioréacteur, donnant le phénomène d'auto-ombrage des cellules. La concentration cellulaire dans cette phase est constante et maximale.

- Phase de déclin: toutes les réserves intracellulaires sont épuisées et les conditions deviennent extrêmement défavorables provoquant ainsi la mort cellulaire.

I.2.1.2. Mode semi-continu ou dit *fed-batch*

Ce mode de culture se distingue par l'introduction du milieu au fur et à mesure de la culture, jusqu'à atteindre le volume final souhaité. Au lancement de la culture, le photobioréacteur n'est que partiellement rempli, et le milieu neuf est apporté au fur et à mesure du développement des cellules. La culture est généralement terminée quand le photobioréacteur est plein. Le mode *fed-batch* permet d'optimiser la productivité de la biomasse et d'éviter une inhibition par la limitation en nutriments [32].

I.2.1.3. Mode continu

La culture en continue permet la récolte en permanence de la biomasse et le renouvellement en continu du milieu de culture. Dans ce mode, la culture est réalisée à volume constant. La charge introduite dans le photobioréacteur est équivalente au volume retiré [32]. Ce mode permet de renouveler la culture avec un apport continu en substrats nécessaires à la croissance. Le mode continu permet de mieux maîtriser les conditions opératoires d'une part, et de récolter la biomasse en continu d'autre part [22]. Le photobioréacteur utilisé est constamment alimenté avec le milieu pour que le volume présent au sein du système reste fixe (figure 1.2).

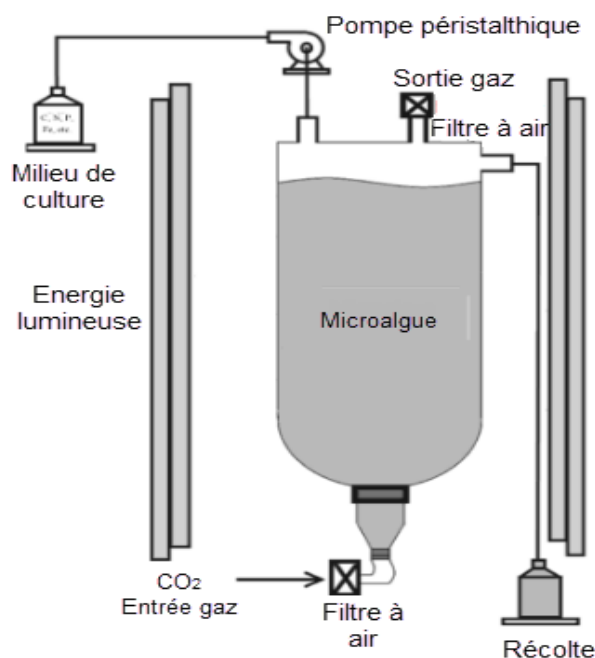


Figure 1.2: Représentation schématique d'un système de culture des micro-algues en mode continu [22].

1.2.2. Systèmes de culture à grande échelle des micro-algues

La culture des micro-algues à grande échelle peut être conduite selon deux systèmes, soit à l'aide de bassins ouverts, ou «raceway», ou dans une enceinte transparente fermée utilisant la lumière naturelle ou artificielle, le «photobioréacteur».

1.2.2.1. Culture en milieu ouvert ou raceway

Les systèmes de culture en milieu ouvert (bassins de culture) sont des étangs de recirculation en boucle fermée avec une profondeur de quelques dizaines de centimètres (figure 1.3). Le mélange et la circulation du milieu sont possibles grâce à une roue à aube. Le flux est guidé par la vitesse de rotation de cette roue. Un bullage permet un apport en CO_2 au milieu, mais le transfert dans la phase liquide (le milieu de culture) est souvent compliqué à cause de la faible profondeur des bassins. La température du milieu fluctue selon les cycles diurnes et saisonniers. Ce système de culture présente l'avantage d'avoir des coûts de fabrication faibles [35]. Toutefois peu d'espèces de micro-algues peuvent être

cultivées en milieu ouvert. La principale contrainte est le risque de contamination par d'autres espèces de micro-algues ou d'autres microorganismes comme les bactéries [25]. Ce système ne permet pas de contrôler l'évaporation, de grosses pertes de milieu de culture étant observées [36].

Cependant, les cultures actuelles se faisant à ciel ouvert concernent des espèces de micro-algues poussant dans des milieux très sélectifs, comme c'est le cas de *Dunaliella salina* qui se développe en milieu salin. Les rendements atteints avec ces systèmes ne sont pas optimaux à cause de la difficulté à contrôler les facteurs environnementaux (échauffement du bassin et phénomènes d'évaporation). La concentration en biomasse pour ce type de culture est généralement peu élevée car l'agitation du milieu est faible et des zones non agitées peuvent subsister [25].



Figure 1.3: Culture de *Dunaliella salina* en phase orange (bassin à gauche) et phase verte (bassin à droite) dans le système raceway à double circuit de l'usine de culture de l'ITC (Institut Technologique de la Grande Canarie, Espagne) [37].

1.2.2.2. Culture en milieu fermé ou photobioréacteur

Les photobioréacteurs sont des réacteurs fabriqués à partir de matériaux transparents. Leur conception est basée sur la surface éclairée (par lumière naturelle ou artificielle), l'efficacité du mélange et le contrôle des paramètres de culture (température, pH, teneur en CO₂ et en oxygène), afin d'atteindre une productivité maximale. Les photobioréacteurs aboutissent à une forte

concentration cellulaire et une forte productivité comparativement aux systèmes de production dans les bassins ouverts [38, 39, 40, 41]. Les photobioréacteurs peuvent avoir diverses formes géométriques: plates, tubulaires, gaines en plastique ou «plastic bag», verticales ou en spirales (figure 1.4) [22].

Les systèmes fermés ont été conçus pour pallier les problèmes des bassins. Grâce aux contrôles des paramètres de culture, des micro-algues fragiles peuvent être cultivées [38]. La conception des photobioréacteurs doit être optimisée pour chaque espèce de micro-algues, en tenant compte de leur physiologie et de leurs caractéristiques de croissance. En revanche, les photobioréacteurs sont très chers à fabriquer et à exploiter [40, 41, 42, 43].

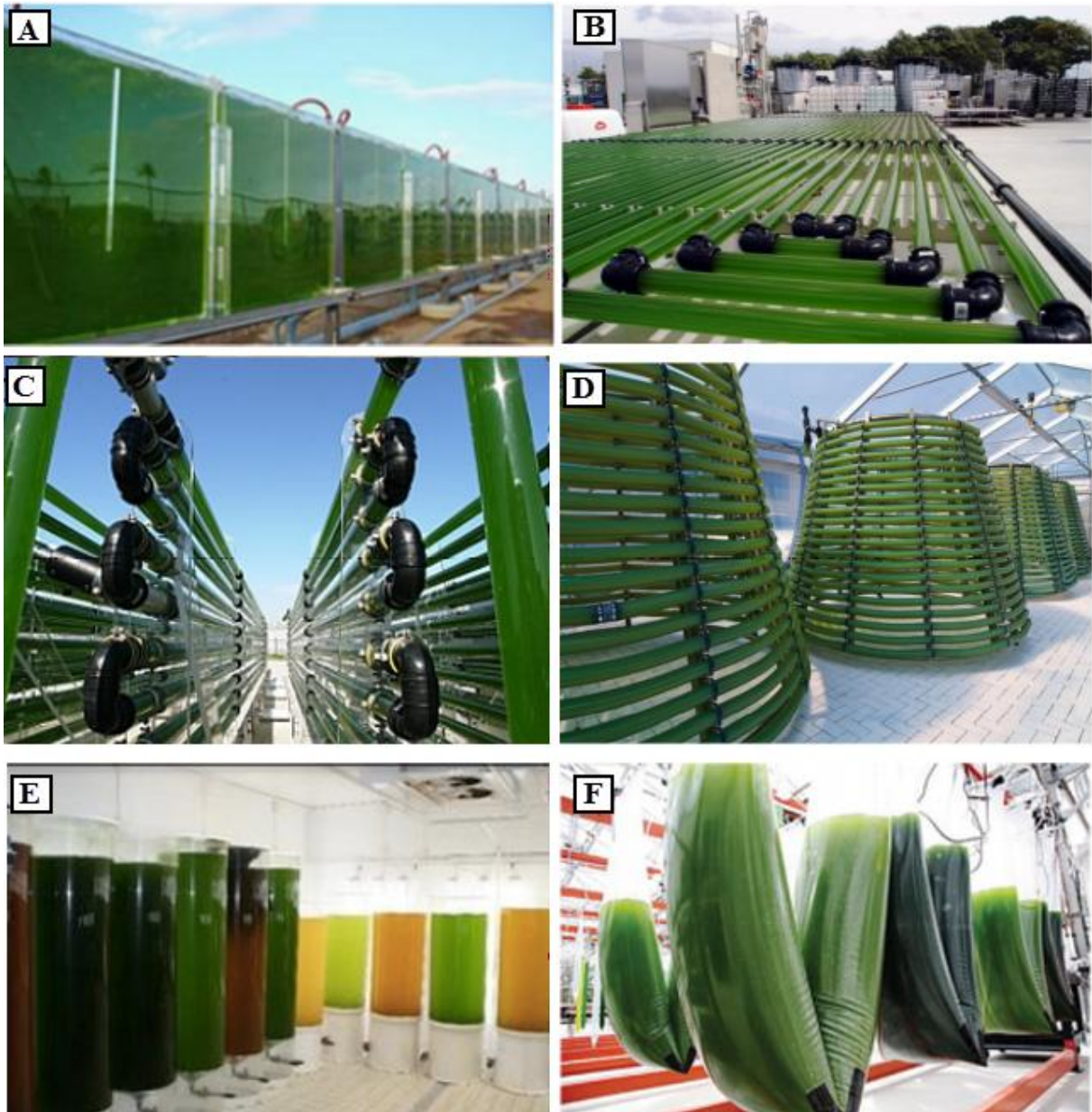


Figure 1.4: Différents types de photobioréacteurs.

(A) photobioréacteur plat, (B) photobioréacteur tubulaire horizontal, (C) photobioréacteur tubulaire vertical, (D) photobioréacteur en spirale, (E) photobioréacteur cylindrique et (F) gaines en plastique «plastic bag» [44, 45, 46].

I.3. Besoins fondamentaux et physiologie des micro-algues

L'activité autotrophe des micro-algues requière l'acquisition d'éléments minéraux pour la croissance des cellules, dont les besoins varient en fonction des espèces. D'une manière générale, les micro-algues nécessitent un apport en carbone, en azote, en phosphore et parfois en silice (Si) selon les espèces. Des macroéléments et des microéléments sont également nécessaires [47]. La culture

de nombreuses espèces impose l'ajout de vitamines et de composés organiques qui sont des cofacteurs d'enzymes [48]. L'hétérotrophie peut également être pratiquée chez certaines micro-algues. A l'obscurité, l'énergie lumineuse est alors remplacée par le catabolisme de composés organiques carbonés tels que les sucres et les acides organiques.

La culture des micro-algues nécessite des éléments nutritifs apportés par les milieux d'enrichissement. La connaissance de ces besoins représente donc une information déterminant la cultivabilité d'une espèce [26].

Les facteurs écophysologiques doivent être favorables pour permettre la croissance des micro-algues. Il s'agit principalement de la lumière, la température, le pH et la salinité. En considérant un facteur isolé, chaque espèce se développe de manière optimale pour une valeur donnée du paramètre. La lumière représente la source d'énergie pour les organismes photosynthétiques et est par conséquent un facteur écophysologique très important pour leur survie [49, 50]. Une étude de l'effet de ces facteurs représente donc une étape indispensable pour la valorisation des micro-algues afin d'optimiser les rendements de production en biomasse et en composés d'intérêt [51].

I.4. Techniques de récoltes des micro-algues

La récolte représente, selon les techniques utilisées, 20 à 40% du bilan énergétique et économique de la filière de production de la biomasse [52, 53, 54, 55]. Cependant, la récolte peut se faire par différentes techniques:

I.4.1. Flocculation

La flocculation est un procédé dans lequel les particules en solution se rejoignent afin de former des agrégats appelés «flocs» [56]. Lorsque la flocculation est combinée à la sédimentation, à la filtration ou à la centrifugation, son efficacité est nettement augmentée [57]. La flocculation nécessite souvent une intervention humaine avec l'ajout de flocculants. Ces derniers sont des substances chimiques (sels métalliques, polyélectrolytes, chaux, etc.) qui neutralisent la charge négative et permettent l'agglomération des cellules. La flocculation a été proposée par plusieurs auteurs comme étant une technique efficace pour la

récolte des micro-algues. Elle peut être utilisée à grande échelle et peut être appliquée sur plusieurs espèces de micro-algues [58, 59].

Pour certaines micro-algues et sous certaines conditions de culture, la floculation peut survenir de manière naturelle, on parle alors d'auto-floculation. Le principal processus de l'auto-floculation est la précipitation et l'adsorption de sels inorganiques à la surface des micro-algues suite à l'augmentation du pH provoquée par la consommation du CO₂ pendant l'activité photosynthétique des micro-algues. Les précipités formés ont une charge de surface positive qui permet leur adsorption et la neutralisation stœchiométrique des charges négatives à la surface des micro-algues [60]. Les précipités impliqués dans l'auto-floculation peuvent être des phosphates, des carbonates de magnésium et de calcium, des phosphates de calcium [61] et des hydroxydes de magnésium [62].

La bio-floculation est un processus comparable à la floculation chimique en termes d'efficacité de récolte et de temps de sédimentation [63]. Ce processus est basé sur la sécrétion de biopolymères (polysaccharides, polymères extracellulaires, protéines, acides nucléiques, lipides) par les micro-algues qui, produites en grandes quantités en phase de croissance exponentielle, agissent comme des flocculants et provoquent la formation de floccs de micro-algues [64].

1.4.2. Centrifugation et flottation

Reconnue comme étant une des techniques les plus utilisées, la centrifugation est coûteuse en termes d'investissements et de consommation énergétique. C'est une technique de séparation utilisant, comme son nom l'indique, la force centrifuge. La taille des micro-algues et leur différence de densité avec le milieu sont des paramètres essentiels de la séparation centrifuge [65].

Plusieurs systèmes utilisant cette technique ont été développés: la centrifugeuse à bol, le séparateur à assiettes, le décanteur centrifuge et l'hydrocyclone. Des études montrent que pour certaines micro-algues, la récupération de la biomasse est entre 90 et 100%, en moins de 5 min de traitement [66, 67].

Certaines micro-algues et cyanobactéries flottent de manière naturelle. Ces espèces sont parfois pourvues de vacuoles à gaz ou bien riches en lipides. Cependant, une grande partie des espèces de micro-algues ne présente pas cette caractéristique, mais il est tout de même possible de récolter la plupart par flottation assistée [68].

I.4.3. Filtration

La filtration consiste à faire passer le fluide à filtrer à la surface du filtre. Ce type de technologie est valable pour des cellules ayant une taille supérieure à 40 µm. C'est certainement le procédé le plus simple à mettre en œuvre. Elle est aussi adaptée pour les micro-algues filamenteuses, vivant en colonie. La filtration sur soies est par exemple utilisée pour la récolte de la spiruline [31].

Il est parfois utile d'ajouter en suspension ou directement sur le filtre des facilitateurs de filtration pour augmenter les performances de séparation. Cet ajout ne doit pas limiter les valorisations de la biomasse et doit être peu coûteux. Pour des micro-algues de l'ordre de grandeur de *Dunaliella salina*, la filtration sur filtre de sable, sur fibre de cellulose et sur beaucoup d'autres supports, n'est pas efficace [69].

I.5. Importance et applications biotechnologiques des micro-algues

La diversité des micro-algues et leur plasticité métabolique font de ce groupe de microorganismes un réservoir de composés d'intérêt et favorise la diversification des voies de valorisation (figure 1.5). Selon les applications, la biomasse peut être utilisée dans sa globalité (sous forme de poudre, comprimés, capsules ou pastilles) ou sous forme d'extraits de composés à hautes valeurs ajoutées [70, 71, 72].

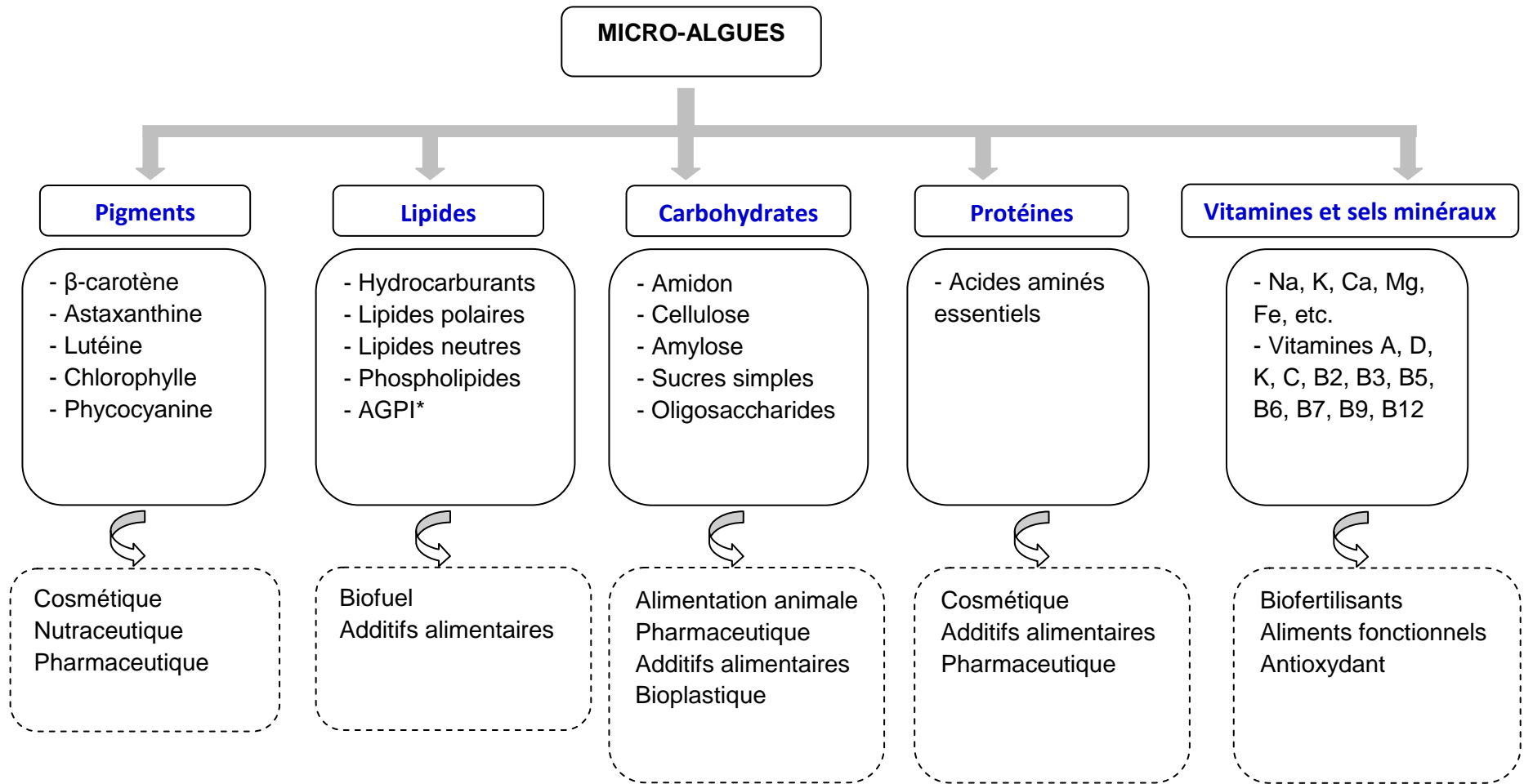


Figure 1.5: Valorisation biotechnologique des micro-algues dans différents domaines [23, 73, 74].

*AGPI: acides gras polyinsaturés.

Les molécules extraites à partir des micro-algues sont exploitées dans l'alimentation humaine et animale, dans le domaine cosmétique et pharmaceutique, et dans diverses applications environnementales comme par exemple la production de bioénergie et le traitement des eaux usées [23, 75, 76]. Les études sur les micro-algues ont fait l'objet de recherche de diverses molécules antioxydantes, antibactériennes, anticancéreuses, anti-inflammatoires et antidiabétiques [16, 77, 78, 79, 80].

I.5.1. Nutrition humaine et industries agro-alimentaire

La nutrition humaine représente la première voie de commercialisation des micro-algues. Ces dernières peuvent être utilisées comme compléments alimentaires pour leurs richesses en protéines, vitamines et sels minéraux [73, 81]. Elles sont considérées comme une source potentielle d'acides gras polyinsaturés (AGPI). Ces AGPI sont utilisés en nutrition humaine pour leurs vertus thérapeutiques [73].

Une des voies de valorisation intéressante à partir des micro-algues est celle de la production des pigments. Ces pigments sont utilisés en industrie agro-alimentaire, principalement en tant que colorants et agents antioxydants. C'est le cas du β -carotène qui est synthétisé par la micro-algue *Dunaliella salina*. Beaucoup de pigments utilisés en industrie sont retrouvés chez les micro-algues, comme l'astaxanthine synthétisée par l'algue *Haematococcus*, la lutéine, la zéaxanthine et la canthaxanthine [70]. Un effet thérapeutique préventif vis-à-vis de certains cancers est attribué à ces pigments [82].

Les polysaccharides issus des micro-algues sont exploités dans l'industrie agroalimentaire en tant qu'agents gélifiants ou épaississants. Le glycérol (molécule intervenant dans les systèmes d'osmorégulation des micro-algues), est exploité dans l'agroalimentaire comme édulcorant [74].

I.5.2. Industries pharmaceutiques

Les micro-algues sont une source intéressante de molécules bioactives et de toxines utilisables dans la formulation de nouveaux médicaments. Ces molécules ne sont pas faciles à synthétiser en utilisant des méthodes chimiques. Plusieurs micro-algues sont capables de produire différents types de molécules à effet antimicrobien (alcools, bromophénols, acides gras, polysaccharides, tanins et terpénoïdes) (tableau 1.1). Elles peuvent produire également plusieurs composés hépatotoxiques et neurotoxiques comme par exemple les . Ces composés ont des applications potentielles dans l'industrie pharmaceutique [23].

Les polysaccharides extraits des micro-algues trouvent des applications industrielles et commerciales dans le domaine médical (activités antioxydantes, antivirales, antitumorales et anticoagulantes) [83]. Les micro-algues produisent une large gamme de vitamines (A, B1, B2, B6 ,B12, E, K, etc.) qui ont un intérêt commercial important [84].

Tableau 1.1: Activité antimicrobienne des composés bioactifs extraits à partir de certaines espèces de micro-algues.

Micro-algue	Molécule active	Germes-cibles	Références
<i>Dunaliella salina</i>	Dérivés indoliques, acides gras polyinsaturés, β -ionone, néophytadiène	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	[85, 86, 87]
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Acide eicosapentaénoïque	<i>S. aureus</i> MRSA	[88, 89]
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Acides gras à courtes chaînes: (acide butanoïque et lactate de méthyle)	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	[90, 91]
<i>Chlorococcum humicola</i>	Pigments caroténoïdes et pigments chlorophylliens	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi, <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus niger</i>	[92]
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Acide gras à longues chaînes	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Salmonella</i> sp.	[93]
<i>Porphyridium aerugineum</i>	Phycobiliprotéines	<i>Candida albicans</i>	[94]
<i>Rhodella reticulata</i>	Exopolysaccharides	<i>S. aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i>	[94]

I.5.3. Domaine cosmétique

Les extraits de micro-algues sont principalement utilisés dans les produits de soin du visage et de la peau. Ils sont également utilisés dans la fabrication de produits de soin des cheveux et de protection solaire. La spiruline et la chlorelle sont utilisées pour la production de produits de soins pour la peau. Certaines molécules issues des micro-algues sont utilisées dans les produits cosmétiques en tant qu'agents antioxydants et épaississants [75].

Parmi les principales espèces de micro-algues utilisées dans la fabrication de produits cosmétiques, on peut citer *Chlorella vulgaris*, *Spirulina platensis*, *Dunaliella salina* et *Nannochloropsis oculata* [23].

I.5.4. Domaine énergétique

L'exploitation des micro-algues dans le domaine des bioénergies représente un fort potentiel, surtout si l'on considère la raréfaction des énergies fossiles. Ces micro-algues accumulent de manière importante des composés carbonés utilisables comme carburant après extraction. Le rendement de production des acides gras à l'hectare pour la production de bioénergie peut être 30 fois supérieur chez les micro-algues par rapport aux plantes supérieures oléagineuses [95].

Les micro-algues peuvent produire du biogaz par méthanisation. Certaines sont riches en sucres et peuvent produire du bioéthanol. D'autres sont riches en lipides et permettent la production de biodiesel [25]. Pour fabriquer du biocarburant, appelé biocarburant de troisième génération, les espèces de *Chlorella* sont des candidates prometteuses pour cette application grâce à leur fort contenu lipidique et leur capacité à croître rapidement [96, 97].

II. LA MICRO-ALGUE *Dunaliella*

II.1. Historique, distribution et habitat des micro-algues du genre *Dunaliella*

La micro-algue verte du genre *Dunaliella* a été décrite pour la première fois en 1838 par Dunal qui était le premier à reconnaître que la couleur rouge de quelques marais salants de Montpellier (France) était due à une micro-algue qu'il a nommé *Haematococcus salinus* [98]. En 1905, Teodoresco a proposé pour la première fois la taxonomie de cette micro-algue en la classant dans un nouveau genre appelé *Dunaliella*, avec *Dunaliella salina* comme espèce-type. D'autres nouvelles espèces ont été par la suite décrites, telles que *Dunaliella peircei* par Nicolai et Baas Becking [99], *Dunaliella parva* et *Dunaliella minuta* par Lerche [100] et *Dunaliella primolecta* par Butcher [101].

Les micro-algues du genre *Dunaliella* peuvent être présentes dans les eaux douces, les eaux salines et les eaux hypersalines (Sebkhas et mers à fortes salinités). Une seule espèce est présente dans les eaux acides, *Dunaliella acidophila* Massjuk [102, 103].

Dunaliella est une micro-algue appartenant au domaine Eukaryota, au règne Plantae, au phylum Chlorophyta, à la classe Chlorophyceae, à l'ordre Chlamydomonadales (Volvocales), à la famille Dunaliellaceae et au genre *Dunaliella* [104].

II.2. Taxonomie du genre *Dunaliella*

La taxonomie du genre *Dunaliella* n'est pas encore au point. Sur la base des critères morphologiques et physiologiques (dont l'accumulation du β -carotène), 28 espèces ont tout d'abord été décrites, dont 23 halophiles [8, 102]. Cependant, parmi ces espèces, seules quelques unes ont été séquencées. Ce séquençage a été fait au niveau de la région ITS (Internal Transcribed Spacer), du gène codant pour l'ARNr 18S (figure 1.6) et du gène *rbcL* (ribulose-bisphosphate carboxylase) [105, 106, 107]. Certaines souches ont été séquencées pour les 3 « gènes/région » et d'autres pour deux ou un gène. Cependant, la région ITS est celle qui est la plus utilisée.

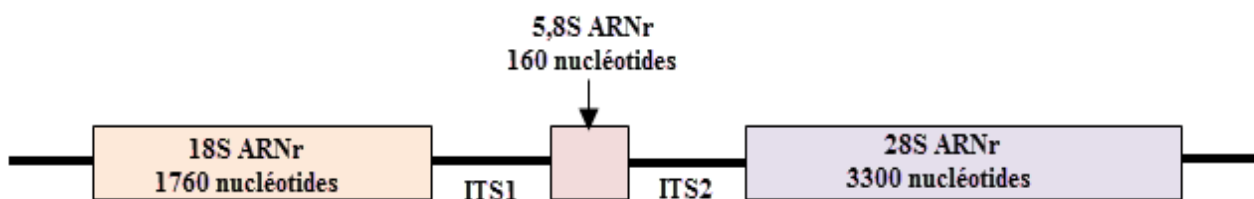


Figure 1.6: Schéma des séquences d'ADN codant pour l'ARN ribosomique eucaryote [108].

La taxonomie de ce genre a été rendue encore plus complexe en raison de l'absence de souches-types des espèces décrites, et aussi de plusieurs erreurs d'identification commises par certains auteurs [107]. En effet, la plupart des études étaient orientées vers la physiologie et la biotechnologie des espèces de *Dunaliella*, surtout *D. salina* et *D. tertiolecta*, et ce, vu l'importance économique de ces deux espèces [106].

La figure 1.7 montre l'arbre phylogénétique des souches de *Dunaliella* qui ont subi un séquençage de la région ITS (les mêmes résultats ayant été obtenus avec les gènes *rbcl* et *18S*) [106, 107]. Ces auteurs ont constaté la présence de 5 espèces uniquement: *D. salina*, *D. parva*, *D. viridis*, *D. acidophila* et *D. tertiolecta*. Cette dernière regroupe en faite d'autres souches classées auparavant dans les espèces *D. quartolecta*, *D. primolecta*, *D. bioculata*, *D. minuta* et *D. polymorpha* qui se sont révélées être toutes des synonymes de *D. tertiolecta*. Toutes les souches de *Dunaliella* qui ont été séquencées par la suite (jusqu'à l'heure actuelle) ont été rattachées à l'une de ces cinq espèces citées précédemment.

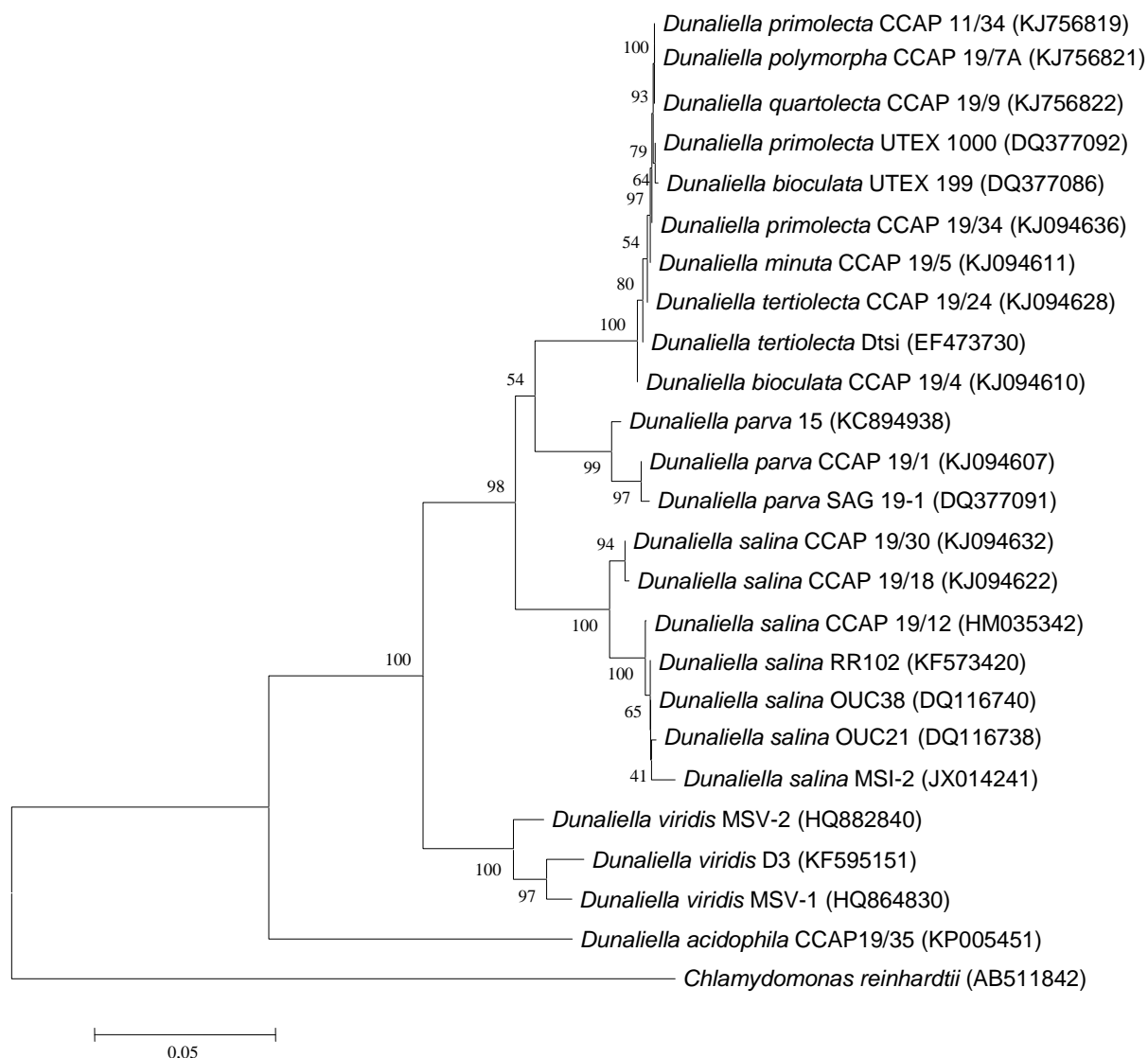


Figure 1.7: Arbre phylogénétique (neighbor-joining) basé sur l'analyse des séquences du gène codant pour la région ITS de quelques espèces du genre *Dunaliella* présentes dans la base de données NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Les nombres figurant au niveau des nœuds indiquent les taux du « bootstrap » (exprimés en pourcentages de 1000 re-échantillonnages). La barre indique 0,05 substitution par position de nucléotide. L'espèce *Chlamydomonas reinhardtii* est donnée comme « outgroup ».

Note: il n'existe pas de souches-types pour le genre *Dunaliella*.

II.3. Morphologie et structure de *Dunaliella*

Dunaliella est une micro-algue unicellulaire, biflagellée, possédant un grand chloroplaste qui occupe la moitié du volume cellulaire. La cellule de *Dunaliella* peut être ellipsoïde, ovoïde à sphérique, piriforme ou fusiforme (figure 1.8), d'une largeur variant de 4 à 10 μm , et d'une longueur variant de 6 à 15 μm . Par ailleurs, la taille de la cellule est affectée par les conditions de cultures [8]. Des cellules géantes, de forme irrégulière, amiboïde, peuvent apparaître dans des cultures vieilles à des températures basses [6].

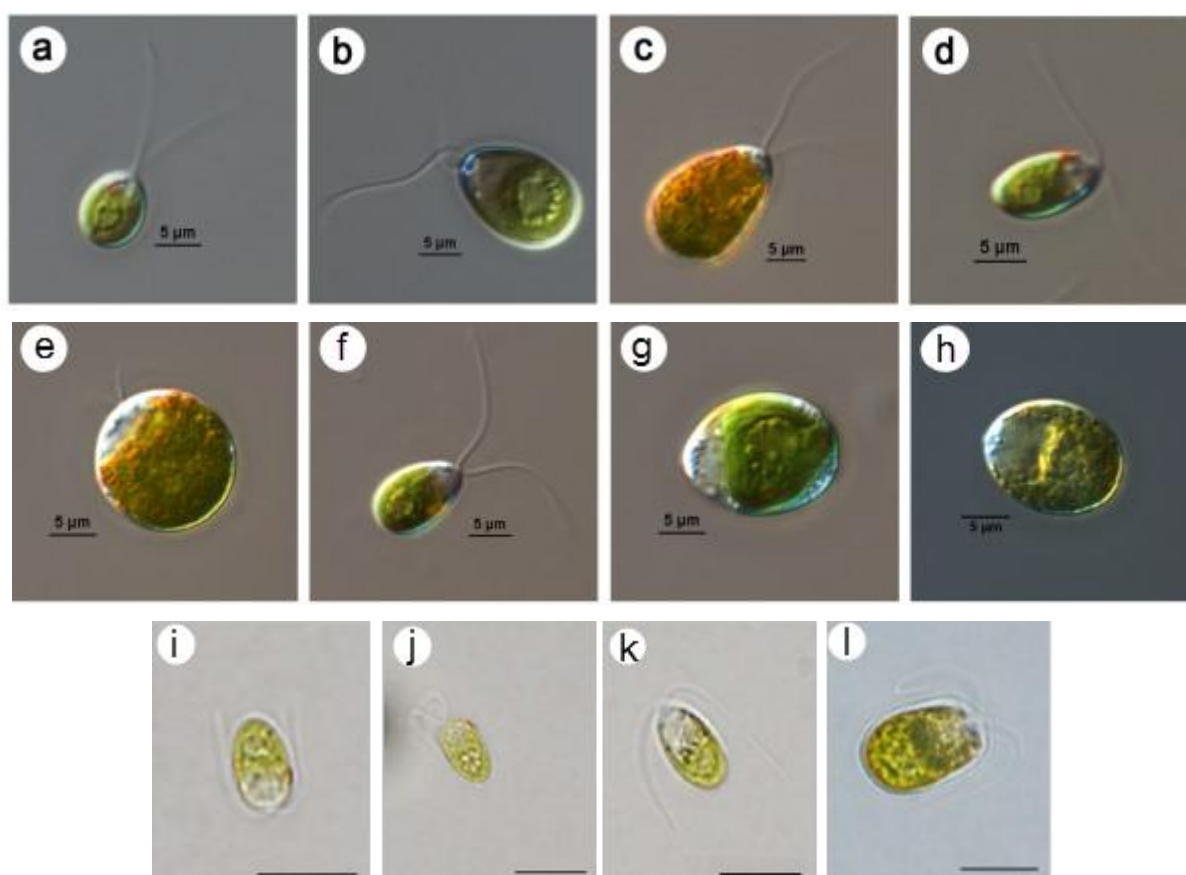


Figure 1.8: Aspect microscopique de différentes espèces de *Dunaliella* [106, 109]. (a) *Dunaliella* sp. S086, (b, c) *D. salina* S089, (d) *D. viridis* S115, (e) *D. salina* S135: cellule stressée (4,5 M NaCl), (f) *Dunaliella* sp. S147, (g) *D. salina* CS265, (h) *D. salina* CS265 (2,5 M NaCl), (i) *D. parva* CCAP 19/9, (j) *D. primolecta* UTEX 1000, (k) *D. tertiolecta* CCAP 19/24 et (l) *D. bardawil* ATCC 3086.

La cellule est caractérisée par l'absence de la paroi cellulaire. Le contenu cellulaire est entouré par une fine membrane élastique ce qui confère aux cellules de *Dunaliella* un changement rapide de la forme en réponse aux changements osmotiques. La cellule devient alors sphérique, mais elle reprend sa forme initiale au retour des conditions optimales. La cellule est mobile grâce à la présence de deux longs flagelles insérés au niveau de la terminaison antérieure de la cellule. La longueur des flagelles est variable d'une espèce à une autre. Une papille est observée dans la terminaison flagellaire chez les cellules jeunes. Le chloroplaste est généralement en forme de cloche et contient un grand pyrénioïde entouré par des granules de polysaccharides (figure 1.9). Le pyrénioïde est présent chez toutes des espèces de *Dunaliella* à l'exception de certaines espèces d'eau douce [6].

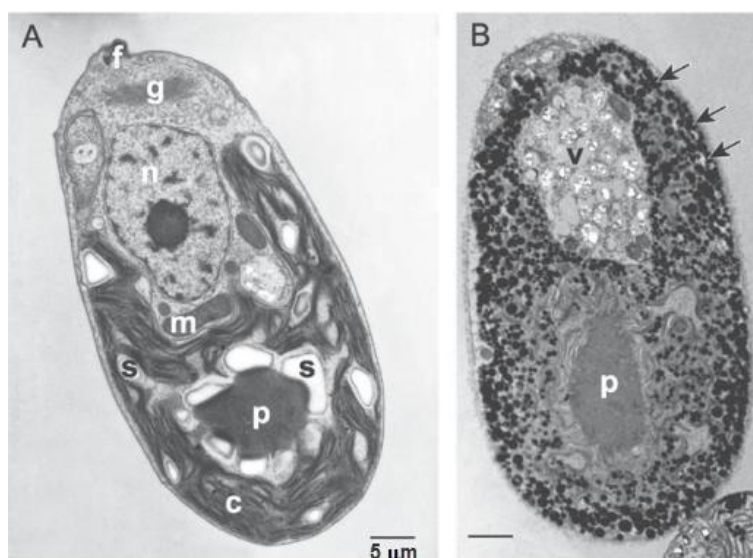


Figure 1.9: Micrographie électronique (coupe longitudinale) de **(A)** cellule verte de *Dunaliella tertiolecta*, **(B)** cellule stressée de couleur orange de *Dunaliella salina* [8].

(c) chloroplaste, (p) pyrénioïde, (s) grains d'amidon, (m) mitochondrie, (n) noyau, (g) appareil de golgi, (f) flagelles, (v) vacuole, (→) pigments caroténoïdes (surtout le β-carotène).

Certaines espèces possèdent un stigma qui est «un corpuscule imprégné de pigments caroténoïdes» localisé dans la terminaison postérieure du chloroplaste [8, 98, 110].

Les cellules végétatives de *Dunaliella* apparaissent vertes dans les conditions favorables. En revanche, lorsqu'elles sont exposées à des conditions de stress

environnementales, certaines espèces de *Dunaliella* produisent et accumulent de grandes quantités pigments caroténoïdes (surtout le β -carotène), donnant ainsi la formation d'aplanospores (formes de résistances) sphériques et de couleur orange [8].

II.4. Cycle de vie et reproduction chez le genre *Dunaliella*

La prolifération des micro-algues s'effectue principalement par reproduction asexuée appelée encore multiplication végétative (une cellule mère se divise en deux cellules filles génétiquement identiques). Cependant, comme la majorité des eucaryotes, les micro-algues peuvent aussi se multiplier par reproduction sexuée [111].

Dunaliella salina et certaines autres espèces peuvent se multiplier par reproduction asexuée ou sexuée (figure 1.10). Une faible concentration en sel (2 à 5%) favorise l'activité sexuée, tandis que les taux élevés en sel (> 30%) diminue cette activité [98].

II.4.1. Reproduction asexuée «végétative»

La reproduction végétative chez *Dunaliella* commence par la division du noyau, suivie immédiatement par la formation d'un sillon. Ce sillon permet la division du chloroplaste et du pyrénoloïde, jusqu'à ce que les deux cellules filles ne restent connectées que par un pont cytoplasmique incolore. Par la suite, chacune des cellules filles forme un second flagelle et commence à tourner dans des directions opposées jusqu'à la séparation [6]. Les cellules peuvent être isolées ou parfois regroupées pour former un agrégat appelé «Palmella» [112].

II.4.2. Reproduction sexuée

Chez *Dunaliella*, la reproduction sexuée est stimulée par la réduction de la salinité du milieu de culture. L'accouplement aura lieu entre les souches «+» et les souches «-». Les cellules commencent par se joindre par la pointe de leurs flagelles, puis le gamète (+) établit un tube d'accouplement qui se connecte entre les flagelles du gamète (-), et enfin, les deux cellules fusionnent entre elles par leurs extrémités

antérieures pour former un aplanozygote ayant quatre flagelles. L'aplanozygote grandit de taille, perd ses flagelles et forme une paroi multicouche épaisse. Il va former par la suite 4 à 8 cellules (ou parfois plus) qui se libèrent après rupture de la paroi cellulaire [6].

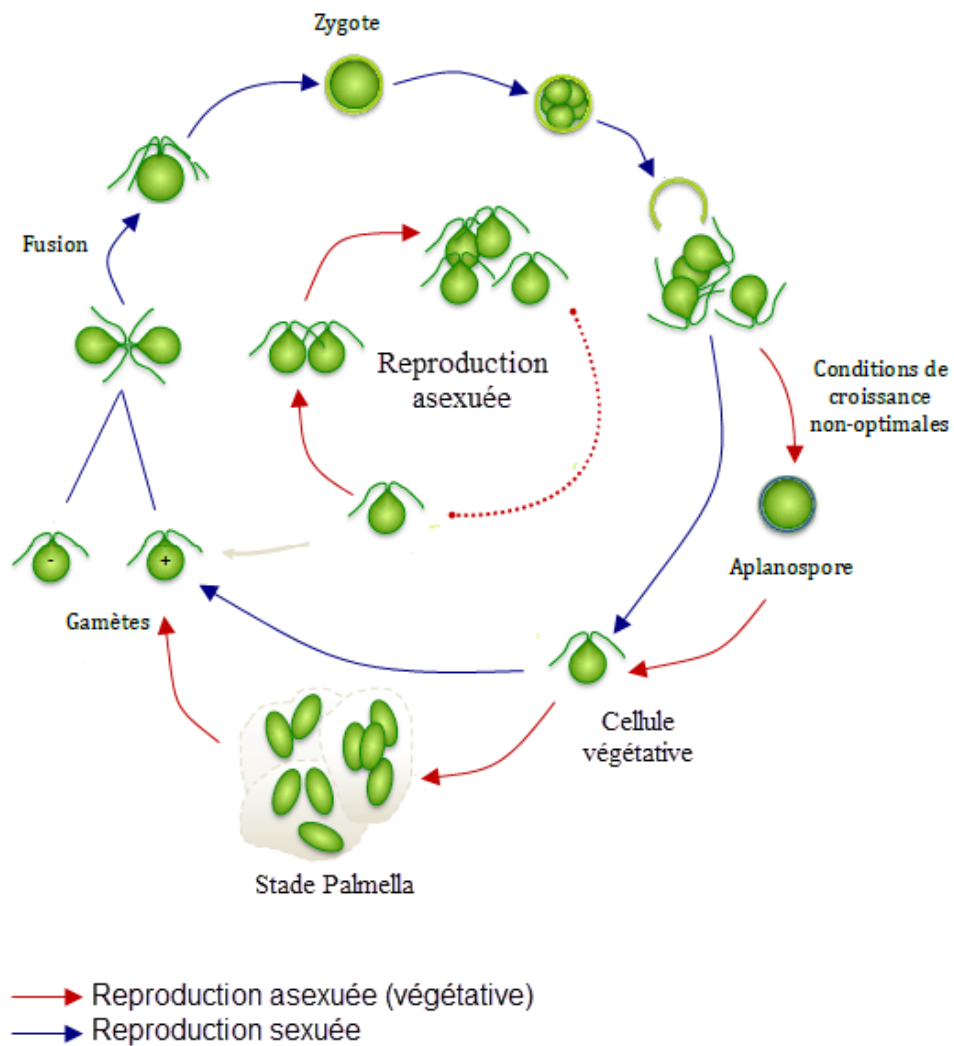


Figure 1.10: Représentation schématique des différents stades du cycle de vie de l'espèce *Dunaliella salina* [33].

II.5. Physiologie de *Dunaliella salina* et mécanisme du stress

Les cellules de *Dunaliella* ont des adaptations très remarquables vis-à-vis des changements environnementaux, surtout celles dues aux variations des teneurs en sel. Ces adaptations sont dues à l'implication du glycérol, qui est un métabolite intracellulaire osmotique synthétisé par *Dunaliella* [113, 114].

Dans des conditions optimales de croissance le temps de dédoublement des cellules est de 5 h, et peut aller jusqu'à 3 jours dans des conditions extrêmes [8]. Selon les souches, la salinité (NaCl) optimale oscille entre 5 et 15 % [115].

D. salina est une espèce capable de croître à des intensités lumineuses variant de 50 à 1500 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ [116]. L'optimum thermique se situe entre 20 et 40°C selon les souches. *Dunaliella salina* supporte également une large gamme de pH (5,5 à 10) avec un optimum situé entre 7 et 8 [8].

La particularité de *D. salina* réside dans l'accumulation de grandes quantités de β -carotène (jusqu'à 10% du poids sec) au sein de granules intracellulaires [117]. La caroténogénèse est favorisée en condition de stress intense des cellules, particulièrement en condition de fort éclaircissement mais aussi de forte salinité, de limitation nutritive (azote, phosphore, soufre et fer) et de température élevée [118].

Pendant la caroténogénèse, le β -carotène est accumulé dans le chloroplaste sous forme de globules. La formation des globules dans lesquels le β -carotène sera accumulé au cours de la caroténogénèse nécessite également la production de lipides. Par conséquent, la voie d'accumulation du β -carotène et celle de la production des lipides sont interdépendantes [98, 117, 119, 120].

La réponse de *D. salina* à un stress salin comprend trois phases principales. Au cours de la première phase, les ions Na^+ et Cl^- pénètrent rapidement (en quelques secondes) dans le cytoplasme. La turgescence diminue fortement en raison d'une augmentation de la concentration en NaCl de l'environnement. Cette réponse est immédiate et commence dès les 5 premières minutes d'exposition au stress. *Dunaliella* peut changer son volume en quelques secondes si elle est soumise à un stress osmotique [121]. Durant la deuxième phase, qui dure environ 1 h, les cellules

rejettent les ions Na^+ et absorbent le K^+ , et ce, pour éviter que le sodium atteigne une concentration toxique. Dans la troisième phase, qui dure de 2 à 3 h, la synthèse d'osmoprotecteurs tend à ajuster la pression osmotique. La fin de cette étape est marquée par la reprise du volume cellulaire [67, 122].

II.6. Voie de synthèse des pigments caroténoïdes de *D. salina*

Les facteurs environnementaux (concentration élevée en sel, forte intensité lumineuse, déficience en nutriments, etc.) qui déclenchent le processus de la caroténogénèse chez *D. salina* ont été très étudiés et rapportés dans la littérature [118, 123, 124]. En revanche, peu d'informations existent sur les mécanismes de perception et de transduction des signaux [8].

L'enzyme-clé dans le processus de la caroténogénèse chez *D. salina* est la phytoène synthase (PSY) qui catalyse le couplage de deux molécules de geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) conduisant à la génération du premier phytoène (molécule incolore à neuf doubles liaisons) lequel est un précurseur des pigments caroténoïdes (figure 1.11). Une fois le phytoène synthétisé, il subit des réactions de désaturation catalysées par la phytoène désaturase, conduisant à la formation de lycopène (qui possède 11 doubles liaisons conjuguées) [8]. Le pigment caroténoïde principal chez *D. salina* est le β -carotène, qui contient un cycle à chaque extrémité. Ce pigment est formé après cyclisation du lycopène par l'introduction d'un cyclohexène à chaque extrémité de la molécule du lycopène. Cette cyclisation est catalysée par la lycopène cyclase (LYC) [125].

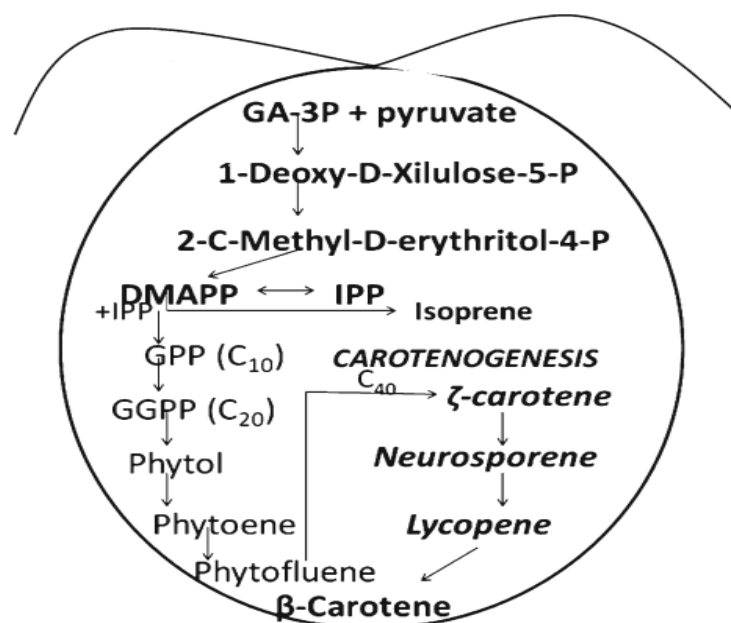


Figure 1.11: Voie de synthèse du β -carotène chez *D. salina* [125].

GA-3P: glyceraldehyde-3-phosphate, DMAPP: dimethylallyl pyrophosphate, IPP: Isopentenyl pyrophosphate, GPP: geranyl pyrophosphate, GGPP: geranyl geranyl pyrophosphate.

II.7. Valorisation du β -carotène produits par *D. salina*

Les pigments naturels sont de plus en plus recherchés et utilisés dans les secteurs alimentaire, cosmétique et nutraceutique. Le β -carotène est utilisé comme colorant alimentaire et comme un complément vitaminé (provitamine A) dans l'alimentation humaine et animale. Ces compléments vitaminés sont des molécules à très haute valeur ajoutés, connues pour leur caractère antioxydant. Le β -carotène chez *D. salina* joue le rôle d'un photo-protecteur et est composé d'un mélange des isomères *cis* et *trans* [126].

Le β -carotène extrait à partir des micro-algues est parmi les premiers produits à hautes valeurs ajoutées qui a été commercialisé [127]. Il est considéré comme un antioxydant naturel, et joue le rôle d'un précurseur de la vitamine A dans l'organisme [128].

Le β -carotène naturel empêche la réduction du nombre de globules blancs et de plaquettes sanguines en cas d'exposition à des rayonnements ionisantes, renforçant ainsi le système immunitaire [129].

Les traitements médicaux associés au β -carotène ont montré leurs capacités dans la prévention et l'inhibition de divers types de tumeurs dans le corps humain. Le β -carotène permet aussi de contrôler le taux de cholestérol et de réduire le risque des maladies cardiovasculaires [127].

III. PIGMENTS CAROTENOIDES ET TECHNIQUES D'EXTRACTIONS

III.1. Caractéristiques chimiques des pigments caroténoïdes et leur classification

Les pigments caroténoïdes sont des molécules appartenant à la famille des terpènes. Les terpènes représentent une grande classe de composés à fonctions très variées. L'unité de base est l'isoprène composé de cinq atomes de carbone (C5). La plupart des pigments caroténoïdes sont des tétraterpènes, issus de la condensation de huit unités en C5 et ont donc une structure hydrocarbonée composée de 40 atomes de carbone (structure en C40) [130, 131]. Il existe aussi des structures en C30 et en C50 [132].

Les pigments caroténoïdes sont des pigments qui absorbent la lumière entre 380 et 550 nm. Ils regroupent les carotènes, composés uniquement d'atomes de carbone et d'hydrogène (caroténoïdes hydrocarbonés) et les xanthophylles comportant en plus des atomes d'oxygène (pigments caroténoïdes porteurs de fonctions alcool, cétone, époxy, etc.) (figure 1.12).

Les pigments caroténoïdes sont des métabolites secondaires principalement synthétisés par les végétaux mais aussi par des levures, des champignons filamenteux, des macroalgues, des micro-algues et certaines espèces bactériennes. Plus de 600 pigments caroténoïdes naturels, ayant des structures très variées, ont été décrits à ce jour. Parmi ces pigments, environ 40 sont présents dans l'alimentation humaine [133]. La variabilité de configuration des doubles liaisons induit la formation d'isomères (*cis* et *trans*) à partir d'un même pigment caroténoïde [18].

Les pigments caroténoïdes sont des molécules extrêmement hydrophobes, présentant donc une faible solubilité dans l'eau. La polarité des pigments caroténoïdes varie d'un pigment à un autre, suivant le groupe fonctionnel lié aux extrémités de la chaîne polyène [134]. Ils sont solubles dans les solvants organiques tel l'acétone, l'éthanol, l'éther diéthylique, le chloroforme et l'acétate d'éthyle. Les carotènes (de nature apolaires) sont soluble dans le *n*-hexane, le toluène et l'éther

de pétrole. En revanche, les xanthophylles telles que la lutéine et la zéaxanthine sont des molécules très polaires, solubles dans le méthanol et l'éthanol [135].

Le spectre UV-visible des pigments caroténoïdes possède souvent trois bandes entre 400 et 500 nm (certains, comme l'astaxanthine, n'en possèdent qu'une). Le degré de conjugaison (double liaison conjuguée) du chromophore détermine les propriétés d'absorption dans la lumière visible du pigment caroténoïde. Plus le nombre de doubles liaisons conjuguées est important plus la longueur d'onde d'absorption maximale du pigment caroténoïde est grande et plus sa couleur tend vers le rouge foncé [136].

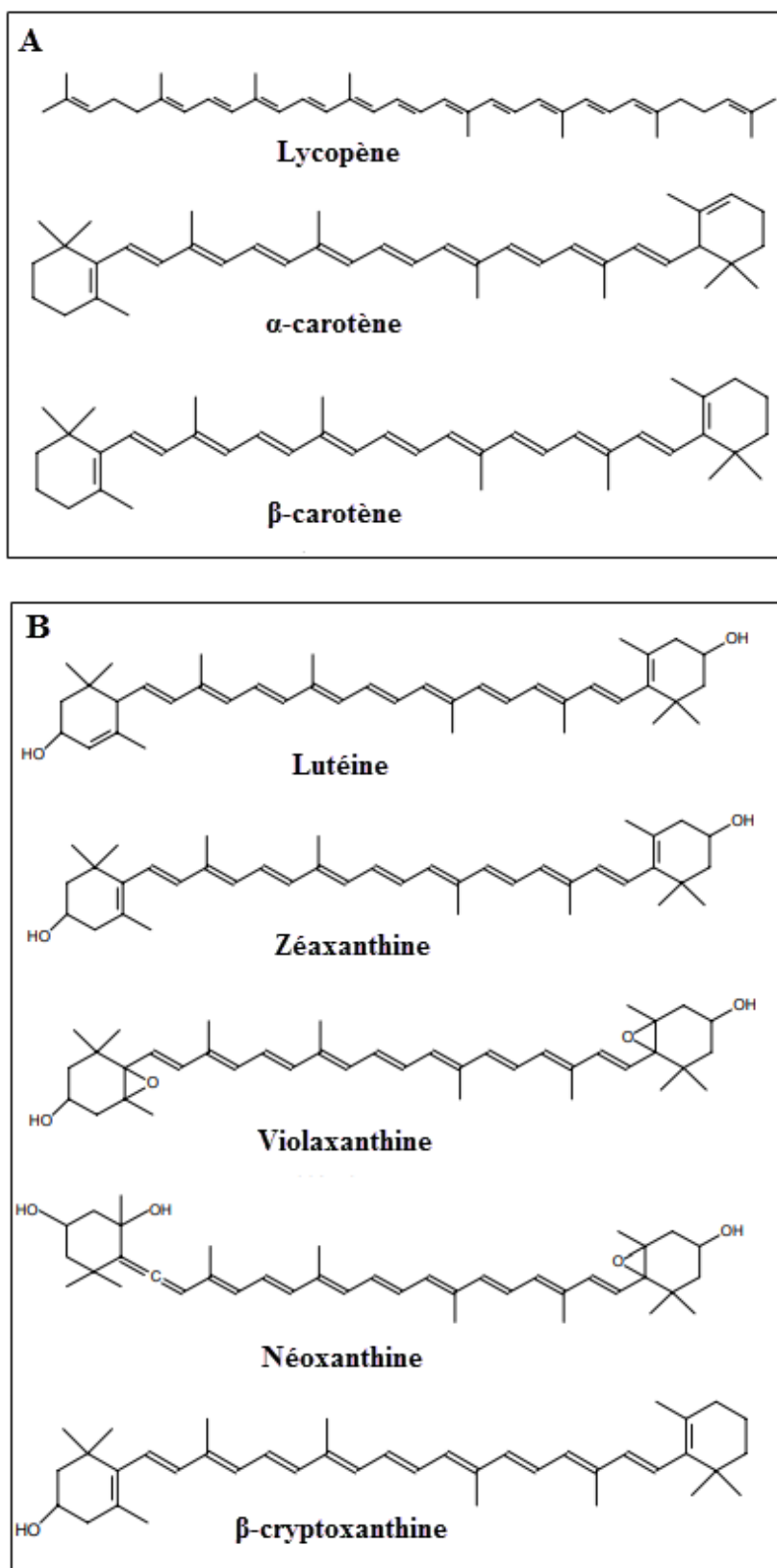


Figure 1.12: Structures des principaux pigments caroténoïdes naturels. **(A)** carotènes et **(B)** xanthophylles [137].

III.2. Propriétés biologiques des pigments caroténoïdes

L'intérêt des pigments caroténoïdes tient à leur propriété antioxydante [138]. Ils peuvent bloquer les composés initiateurs d'oxydation (radiations UV, métaux, réactifs chimiques, etc.) et empêcher ainsi la formation des espèces réactives de l'oxygène. Si des espèces réactives de l'oxygène sont malgré tout formées, la structure des pigments caroténoïdes permet de les piéger, protégeant ainsi la cellule [139].

Certains pigments caroténoïdes sont des éléments nutritifs importants pour l'organisme, notamment en raison de leur rôle en tant que précurseurs de la vitamine A (rétinol), que l'on retrouve dans la circulation sanguine après l'ingestion de ces pigments. Toutefois, le β -carotène représente un candidat important en matière de nutrition préventive vis-à-vis de plusieurs pathologies, notamment les maladies cardio-vasculaires, les cancers et les pathologies associées au vieillissement [127, 129].

Le β -carotène extrait à partir des micro-algues est parmi les premiers produits à hautes valeurs ajoutées qui a été commercialisé [127]. Le β -carotène naturel empêche la réduction du nombre de globules blancs et de plaquettes sanguines en cas d'exposition à des rayonnements ionisants, renforçant ainsi le système immunitaire [129].

Les traitements médicaux associés au β -carotène ont montré leur capacités dans la prévention et l'inhibition de divers types de tumeurs dans le corps humain. Le β -carotène permet de contrôler le taux de cholestérol et de réduire le risque des maladies cardiovasculaires [127].

III.3. Techniques d'extraction des pigments caroténoïdes

III.3.1. Extraction conventionnelle

Il existe plusieurs techniques d'extraction des pigments caroténoïdes: à pression ambiante, sans ou avec agitation et/ou chauffage. Elles sont appelées techniques classiques ou conventionnelles [140].

Il existe diverses techniques d'extraction conventionnelles qui ont été utilisées pour l'extraction des pigments caroténoïdes à partir des matrices naturelles:

l'extraction par Soxhlet, l'extraction liquide-liquide, l'extraction solide-liquide. Ces techniques présentent une reproductibilité limitée, une faible sélectivité, des rendements d'extraction faibles et des temps de manipulation élevés pouvant engendrer l'altération du produit [141].

III.3.2. Extraction assistée par ultrasons

L'extraction assistée par ultrasons (UAE) a suscité beaucoup d'intérêt au cours des dernières années en raison de ses avantages. Elle permet une extraction efficace, en utilisant des températures de travail modérées, ce qui présente un avantage pour les composés sensibles à la chaleur [142].

Les ultrasons sont des ondes mécaniques et élastiques. Les fréquences utilisées varient entre 20 KHz et 10 MHz. Lors d'une extraction UAE, l'échantillon est immergé dans le solvant, puis soumis aux ultrasons à l'aide d'une sonde à ultrasons ou d'un bain à ultrasons [143].

La vibration provoquée par les ultrasons se propage dans le milieu en transportant de l'énergie mécanique sous forme de rapides variations de pression. Le milieu de propagation de l'onde ultrasonore est soumis à une succession de compressions et de décompressions provoquant la formation de bulles. Les ultrasons entraînent de très fortes modifications de la température et de la pression à l'intérieur des bulles. Lorsque la taille des bulles atteint un point critique, elles implosent en libérant de grandes quantités d'énergie. Ce processus est appelé phénomène de cavitation [143, 144, 145, 146].

L'implosion des bulles provoque la rupture des parois cellulaires, facilitant ainsi la libération de leur contenu. La destruction des parois cellulaires favorise l'extraction des composés d'intérêt vers le solvant. Ainsi, l'application des ultrasons accélère l'extraction et dans certains cas permet aussi d'augmenter les rendements [146].

L'UAE est appropriée pour l'extraction des antioxydants tels que les flavonoïdes et les acides phénoliques. Elle a montré également un intérêt dans l'extraction des pigments caroténoïdes à partir de différentes matrices [147, 148, 149, 150, 151].

III.3.3. Extraction par liquides pressurisés «PLE»

L'extraction par liquides pressurisés, appelée encore extraction accélérée par solvant, est une technique d'extraction qui utilise les solvants organiques à température et pression élevées, ce qui maintient le solvant à son état liquide durant l'extraction [141]. La combinaison de la température et de la pression engendre une extraction rapide et une consommation réduite en solvants organiques. L'augmentation de la température d'extraction favorise la solubilisation du composé ciblé. En revanche, la viscosité et la tension de surface du solvant diminuent, ce qui facilite la diffusion du solvant au niveau des surfaces de la matrice d'extraction [152].

Les températures élevées d'extraction favorisent le transfert de la matière et augmentent les taux d'extraction. Elles engendrent une augmentation de la capacité des solvants pour la solubilisation de solutés, une augmentation des taux de diffusion, une meilleure rupture des liaisons soluté-matrice, une diminution de la viscosité du solvant et une diminution de la tension superficielle [153].

Lorsque l'eau est utilisée comme solvant, la méthode PLE est généralement appelée extraction à l'eau surchauffée, extraction à l'eau sous-critique, extraction à l'eau pressurisée ou extraction à l'eau chaude sous pression [154].

L'extraction par PLE commence par l'ajout de la matrice à extraire dans une cellule avec le solvant qui va être chauffé par l'intermédiaire d'un four jusqu'à la température désirée, tout en pressurant la cellule afin de maintenir le solvant à l'état liquide [155]. Pendant un temps t , la pression est maintenue à l'intérieur du système par une vanne de pressurisation. Après l'extraction, l'extrait est collecté dans des tubes placés à la fin du système d'extraction.

L'extraction peut être réalisée en deux modes, le mode statique ou le mode dynamique. En mode statique, le procédé d'extraction se compose d'un ou de plusieurs cycles avec un changement partiel du solvant entre chaque cycle. En mode dynamique, le débit du solvant est maintenu constant durant tout le temps d'extraction ce qui permet un contact long entre la matrice et le solvant [152]. Différents paramètres interviennent dans l'extraction par PLE. Les plus importants sont la nature du solvant d'extraction, la température, la pression, le temps

d'extraction statique et le nombre de cycles. La présence d'eau dans la matrice est aussi importante [152].

La température est un facteur critique dans l'extraction, qui affecte la sélectivité de l'extraction PLE. L'utilisation de températures élevées favorise la rupture des interactions entre la matrice et la molécule à extraire, ces interactions pouvant être de type Van der Waals, liaison hydrogène ou attractions inter-dipôles [156].

L'effet de la pression reste négligeable sur le rendement de l'extraction et en général une pression d'environ 100 bars est utilisée. Dans certains cas, l'utilisation d'un mélange binaire de solvants améliore l'efficacité de l'extraction. Dans ce cas, un premier solvant peut solubiliser le composé à extraire tandis que le deuxième solvant favorise la désorption. Le temps d'extraction et le nombre de cycles influencent l'extraction, car dans certains cas l'extraction reste inachevée à cause du volume limité de solvant d'extraction utilisé. En revanche, quand le nombre de cycles d'extraction augmente, nous pouvons obtenir une extraction complète [152].

La technique d'extraction par PLE a été récemment introduite pour l'extraction des pigments caroténoïdes à partir de différentes matrices. Denery *et al.* [157] ont testé pour la première fois cette technique pour l'extraction de l'astaxanthine à partir de la micro-algue *Haematococcus pluvialis* et de la lutéine à partir de *Dunaliella salina*. Ils ont étudié l'effet du solvant et de la température sur l'extraction de ces deux pigments en comparaison avec la technique d'extraction conventionnelle. Les meilleurs rendements ont été obtenus par la technique PLE.

L'optimisation des conditions de l'extraction des pigments caroténoïdes à partir des micro-algues par la technique PLE a été menée par plusieurs auteurs [158, 159, 160]. Taucher *et al.* [160] ont étudié l'extraction des pigments caroténoïdes à partir de trois souches de micro-algues, *Haematococcus pluvialis* SAG 34-1b, *Chromochloris zofingiensis* SAG 211-14 et *Chlorella sorokiniana* SAG 211-8k.

Ces auteurs ont étudié l'effet du solvant, de la température et de la durée de l'extraction sur les rendements en pigments caroténoïdes. Ils ont signalé que le choix du solvant de l'extraction est primordial et il est dépendant de la polarité du pigment caroténoïde ciblé. Ils ont également souligné l'importance du choix de la température qui ne doit pas être très élevée, vu la nature thermosensible des pigments

caroténoïdes. Ils ont ainsi obtenu des teneurs trois fois supérieures en pigments caroténoïdes avec le dichlorométhane en comparaison avec le *n*-hexane.

III.3.4. Extraction par fluide supercritique

Les techniques d'extraction supercritiques ont été développées dans le but d'éviter l'utilisation de solvants organiques toxiques [161]. Ces techniques utilisent comme solvants des fluides en état supercritique (l'état du fluide lorsque sa température et sa pression sont supérieures à la température et à la pression critiques). Cet état n'existe pas à pression atmosphérique. Les propriétés des fluides supercritiques sont intermédiaires entre celles des gaz et des liquides [162]. Les taux de transfert de matière sont plus grands que dans des solvants liquides classiques à cause des coefficients de diffusion plus élevés et des valeurs de viscosités faibles [86].

Le fluide supercritique le plus utilisé comme solvant est le CO₂ à cause de ses nombreux avantages: abondant, bon marché, inerte, inodore, non toxique et température et pression critiques relativement basses (31,1°C et 7,3 MPa). Le dioxyde de carbone est liquéfié par refroidissement et comprimé à la pression d'extraction choisie. Il est ensuite injecté dans l'extracteur contenant la matrice à extraire, puis le liquide se détend pour se convertir à l'état gazeux pour être conduit vers un séparateur où il sera séparé en extrait et en solvant [163].

Malgré ces propriétés favorables pour l'extraction des molécules bioactives, le frein majeur au développement de cette technologie est le fait que les fluides envisageables ont une pression critique relativement élevée qui entraîne des investissements importants pour construire les appareillages sous pression correspondants [146].

Le CO₂ supercritique possède une très faible polarité et donc non adapté pour l'extraction de composés polaires. Pour l'extraction de telles substances, l'éthanol est ajouté au CO₂ comme co-solvant [164]. L'eau sub-critique a été également utilisée pour extraire des composés polaires. Cependant, comme le point critique de l'eau est très élevé (374°C, 22,1 MPa), l'eau supercritique ne peut donc pas être utilisée pour extraire des composés thermolabiles [165].

L'extraction par fluide supercritique en utilisant le CO₂ a déjà été testée à l'échelle industrielle, pour l'extraction de l'astaxanthine à partir de la micro-algue *Haematococcus pluvialis* [166, 167]. Mouahid *et al.* [168] ont annoncé des résultats intéressants et prometteurs concernant l'extraction du β-carotène à partir de *D. salina* par la technique d'extraction par liquide supercritique [169].

CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

I. DESCRIPTION DES SITES D'ETUDE ET ECHANTILLONNAGE

La micro-algue *Dunaliella* a été recherchée dans les eaux provenant de quatre sebkhas, à savoir, sebkhas d'Oran et d'Arzew situées dans la wilaya d'Oran et les sebkhas de Zahrez Chergui (encore appelée sebkha de Sidi Ameer) et Zahrez Gherbi, situées dans la wilaya de Djelfa.

I.1. Sebkhas d'Oran et d'Arzew

La grande sebkha d'Oran est située à 10 km au Sud-Ouest de la ville d'Oran dans la commune de Misserghin (latitude 35°42'N, longitude 00°48'O, altitude 110 m). Elle s'étend sur une superficie estimée à 56 870 ha. Elle est limitée au Nord par le massif du Murdjajo et au Sud par le massif de Tessala. Elle est formée d'une pellicule de 10 à 30 cm d'eau salée variant selon la pluviométrie. Les précipitations varient entre 378 et 473 mm par an. La sebkha s'assèche complètement durant l'été suite à une très forte évaporation [170]. Au niveau de cette sebkha un seul échantillon d'eau a été prélevé près du Douar Saint Pierre dans la localité d'Es Senia (latitude 35°35'N, longitude 00°42'O) (figure 2.13).

La sebkha d'Arzew est située dans la commune de Bethioua dans la wilaya d'Oran (latitude 35°42'N, longitude 00°18'O). La superficie de cette sebkha est estimée à 5 800 ha. Elle s'étend sur 12 km avec une largeur moyenne de 3 km. La sebkha est bordée sur sa partie Nord par une série de petites dunes qui proviennent de l'accumulation d'argile et de sels [171]. Au niveau de cette sebkha un seul échantillon d'eau a été prélevé (figure 2.13).



Figure 2.13: Sites de prélèvement au niveau des sebkhass d'Oran et d'Arzew (★) (Google maps, 2018).

I.2. Sebkhass de la région de Djelfa

La position des sebkhass de Zahrez Chergui et Zahrez Gherbi est indiquée dans la figure 2.14.

I.2.1. Sebkhass de Zahrez Chergui (Sidi Ameur)

La sebkhass de Zahrez Chergui, appelée encore sebkhass de Sidi Ameur, se situe dans une zone steppique à 45 km de la ville de Djelfa (latitude 34°51'N, longitude 02°48'E, altitude 755 m), à 10 km au Sud-Ouest de la commune de Hassi Bahbah. La sebkhass est d'une superficie de 19 500 ha. Elle a une largeur de 1,5 km et une longueur de 34 km [172]. Des échantillons d'eau ont été prélevés à partir de trois sites nommés S1, S2 et S3 comme c'est indiqué dans la figure 2.15 (a).

I.2.2. Sebkhha de Zahrez Gherbi

La sebkhha de Zahrez Gherbi se situe à 5 km de la commune de Zaâfrane (latitude 34°51'N, longitude 02°36'W, altitude 826 m) et à 30 km de la wilaya de Djelfa, avec une superficie de 22 000 ha [173]. Elle a une largeur de 10 km et une longueur de 25 km, et est bordée au Sud et à l'Est par du sable humide. Le système de la sebkhha est endoréique et salin. Des échantillons d'eau ont été prélevés à partir de trois sites nommés S4, S5 et S6 comme il est mentionné dans la figure 2.15 (b).

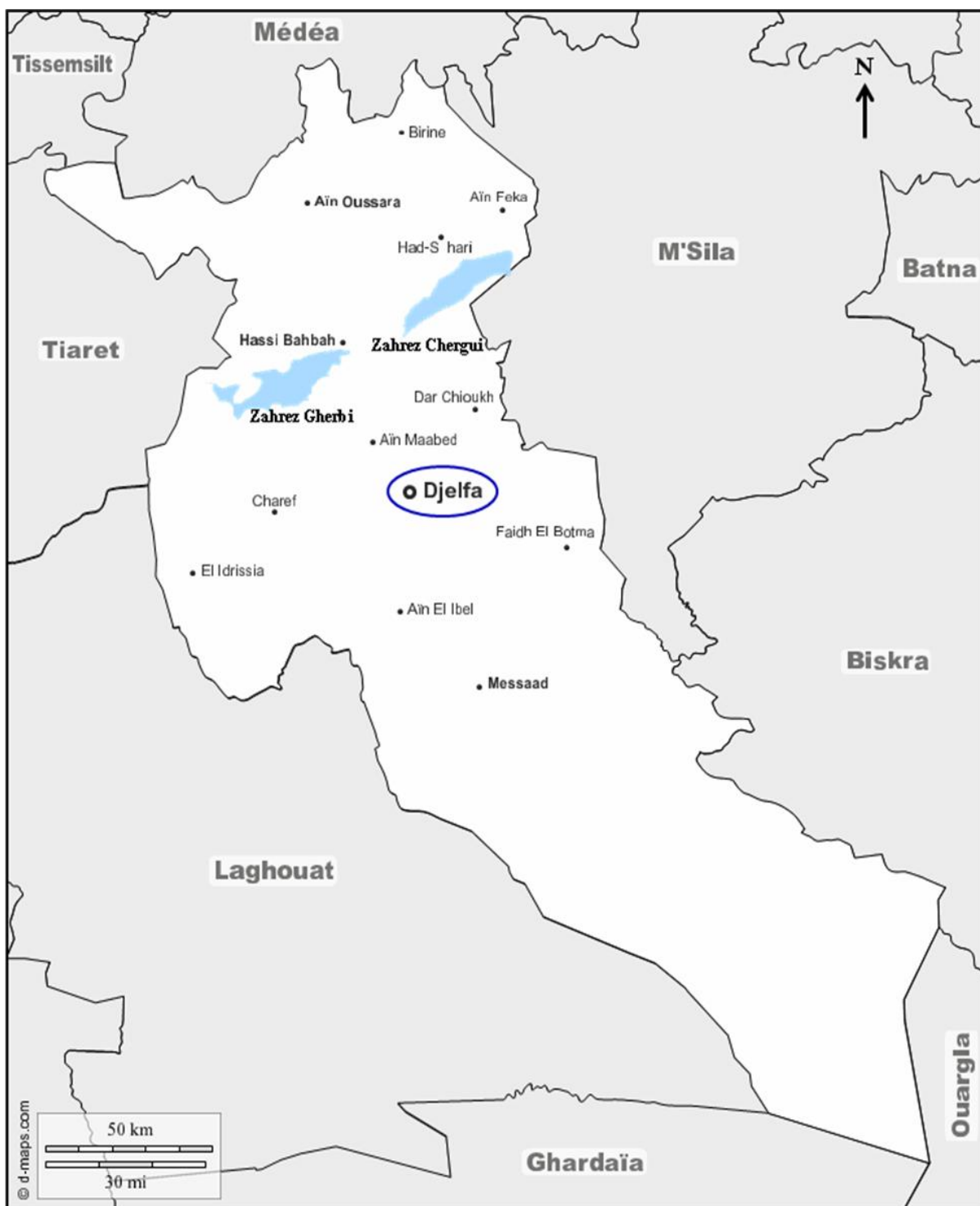


Figure 2.14: Situation géographique des sebkhas de Zahrez Chergui et Zahrez Gherbi (www.d-maps.com).

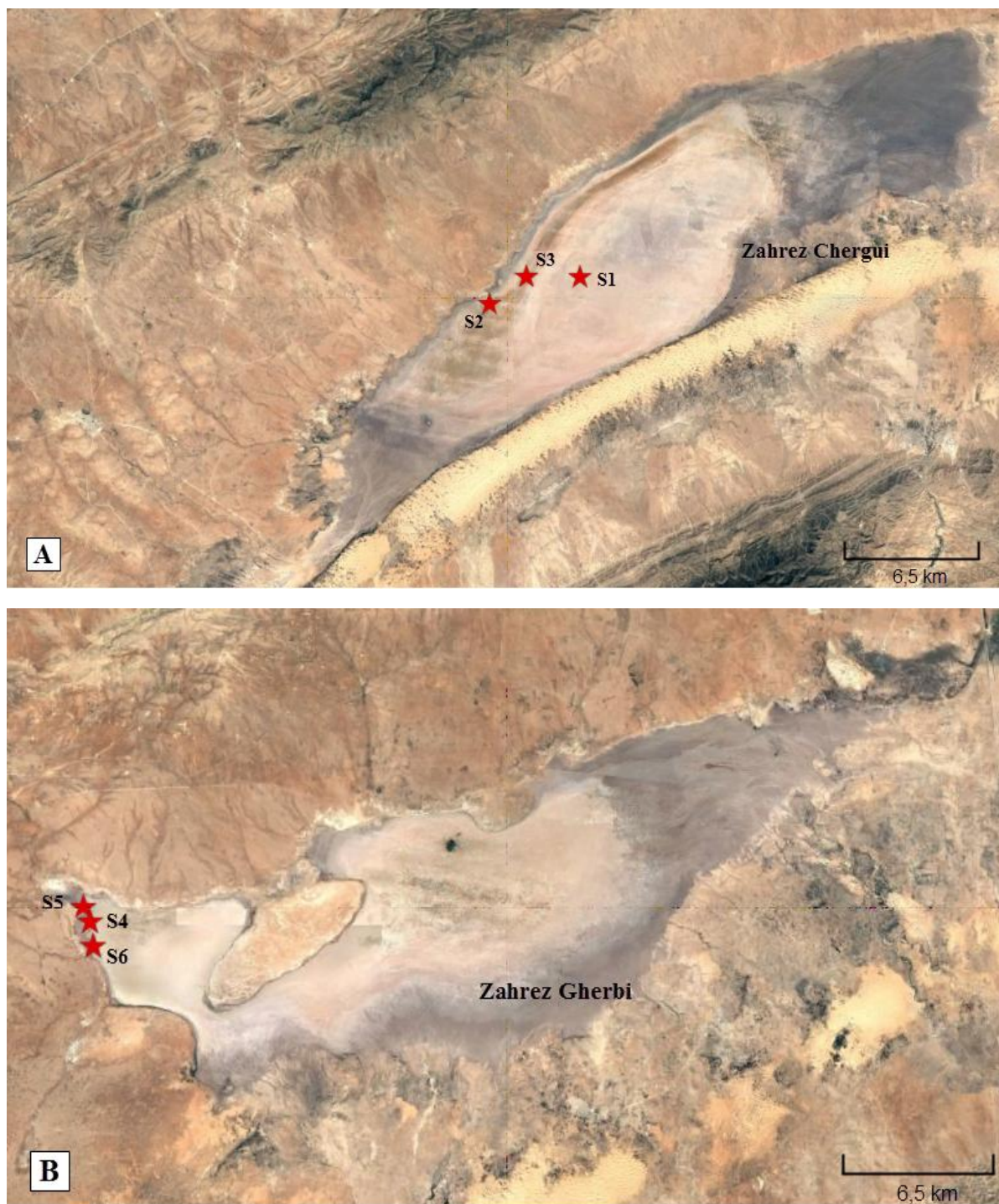


Figure 2.15: Sites d'échantillonnage au niveau de: **(A)** Zahrez Chergui (S1, S2 et S3) et **(B)** Zahrez Gherbi (S4, S5 et S6) (Google earth, 2018).

II. ANALYSES PHYSICOCHIMIQUES DES EAUX

Les eaux prélevées à partir des sebkhas, ainsi que de l'eau de mer utilisée pour la préparation du milieu de culture f/2 [174], ont été analysées en déterminant les paramètres physicochimiques suivants: le pH en utilisant un pH mètre HANNA, la conductivité électrique et la salinité à l'aide d'un appareil multi-paramètres de type WTW Multi 340i. Quelques éléments minéraux comme le calcium, le magnésium, le sodium, le potassium et le chlore ont été analysés à l'aide d'un auto-analyseur SAN-système par une lecture directe en se référant à une courbe d'étalonnage. Une dilution est effectuée lorsque cela est nécessaire.

Le sulfate a été dosé selon la méthode normalisée ISO22743 [175]. Cinq millilitres de chaque échantillon d'eau sont mélangés avec 20 mL d'un mélange de chlorure de baryum (BaCl_2) à 100 g/L et de gélatine à 40 g/L. Le mélange est agité pour uniformiser le trouble, puis laisser reposer pendant 20 min. La lecture l'absorbance est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (Perkin Elmer Lambda 25) à une longueur d'onde de 495 nm. Les résultats sont exprimés en se référant à une courbe d'étalonnage établie en utilisant différentes concentrations d'une solution de sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

III. ISOLEMENT, PURIFICATION ET CONSERVATION DES SOUCHES DE *Dunaliella*

III.1. Isolement des souches de *Dunaliella*

Trois milieux de culture gélosés ont été utilisés pour l'isolement de *Dunaliella*, à savoir le milieu f/2 qui est préparé à base d'eau de mer filtrée à travers une membrane de 0,22 μm et qui est généralement utilisé pour l'isolement des micro-algues provenant des eaux salées [174], ainsi que le milieu Johnson et le milieu Semenenko-Abdullaev, qui sont spécifiques au genre *Dunaliella* [176, 177]. La composition chimique de ces milieux est indiquée dans le tableau 2.2. La concentration en NaCl utilisée pour chaque milieu est de l'ordre de 1, 2 ou 3 M selon les cas.

Tableau 2.2: Composition des milieux de culture, exprimée en g/L.

Milieux Nutriments (g/L)	F/2 [174]	Semenenko-Abdullaev [176]	Johnson [177]
NaCl	1 M	1 M	1 M
NaNO ₃	0,075	0,85	-
KNO ₃	-	-	1
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	-	0,356	-
CaCl ₂ ·2H ₂ O	-	-	0,2
NaHCO ₃	-	-	0,043
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	5,65 × 10 ⁻³	-	-
KH ₂ PO ₄	-	0,68	-
Tris	-	6	-
EDTA	-	8,7 × 10 ⁻²	-
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	4,16 × 10 ⁻³	-	1,8 × 10 ⁻²
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	6 × 10 ⁻⁶	-	-
FeSO ₄ ·7H ₂ O	-	-	-
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2,2 × 10 ⁻⁵	0,022	-
H ₃ BO ₄	-	0,011	6,1 × 10 ⁻⁴
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,8 × 10 ⁻⁴	5,1 × 10 ⁻³	4,1 × 10 ⁻⁵
FeSO ₄ ·7H ₂ O	-	0,014	-
FeCl ₃ ·6H ₂ O	3,15 × 10 ⁻³	-	2,4 × 10 ⁻³
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1 × 10 ⁻⁵	1,6 × 10 ⁻³	5 × 10 ⁻⁵
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1 × 10 ⁻⁵	1,57 × 10 ⁻³	6 × 10 ⁻⁵
KCl	-	-	0,2
(NH ₄) ₆ MoO ₂₄	-	1,1 × 10 ⁻³	3,8 × 10 ⁻⁴
KH ₂ PO ₄	-	-	0,035
MgCl ₂ ·6H ₂ O	-	0,8	1,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	-	0,492	0,5
ZnCl ₂	-	-	4,1 × 10 ⁻⁵
Biotine	5 × 10 ⁻⁷	-	-
Vitamine B ₁₂	5 × 10 ⁻⁷	-	-
Thiamine HCl	1 × 10 ⁻⁴	-	-
pH	7,5	7,5	7,5

Note: pour l'obtention des milieux solides, 20 g/L d'agar sont ajoutés à chacun des milieux.

Avant leur usage, les milieux de culture sont stérilisés à 120°C pendant 20 min. Une fois refroidis à environ 50°C, 20 mL de milieu encore liquide sont coulés dans des boîtes de Pétri dans une zone stérile. Après solidification des milieux gélosés, les boîtes de Pétri peuvent être utilisées pour l'ensemencement.

L'isolement des souches de *Dunaliella* a été effectué par la technique d'ensemencement par étalement sur milieu solide [178]. 100 µL d'eaux provenant des sebkhas sontensemencées puis bien étalées sur les milieux cités précédemment.

Les boîtes de Pétriensemencées sont incubées à une température variant entre 20 et 22°C, sous une intensité lumineuse de 120 µmol photons m⁻² s⁻¹ et une photopériode de 24 h. Les boîtes sont maintenues sous ces conditions pendant 1 à 4 semaines.

III.2. Purification et conservation des souches de *Dunaliella*

Une fois que les colonies commencent à pousser sur le milieu, un examen microscopique est effectué. Cet examen se fait à l'aide d'un microscope optique (Leica) aux grossissements (G × 100 et G × 400). Un stéréozoom de type LEICA MZ6 a aussi été utilisé pour observer les colonies. La purification a été faite en repiquant, par la méthode des stries, les colonies sélectionnées dans une nouvelle boîte de Pétri contenant l'un des milieux de culture utilisés. Cette opération est répétée plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'une culture pure (uni-algales). La sélection des colonies est basée sur l'intensité de leur coloration (verte et orange) et sur la diversité de leur aspect.

Afin d'obtenir une culture axénique (exempte de bactéries), nous avons employé une mixture d'antibiotiques: pénicilline G, streptomycine et néomycine, avec des proportions de 50, 50 et 100 mg par litre, respectivement.

Les souches de micro-algues ainsi purifiées sont conservées à température ambiante dans des boîtes de Pétri contenant le milieu de culture solide le plus adéquat pour leur croissance. Les boîtes sont bien fermées à l'aide de parafilm afin

d'éviter le séchage du milieu. Les micro-algues peuvent aussi être conservées et maintenues dans 150 mL de milieu de culture liquide. L'incubation se fait en présence d'une faible source lumineuse d'intensité de $50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Sur le milieu solide, les souches peuvent être conservées jusqu'à 3 à 4 mois, le repiquage étant renouvelé après cette période. Cependant, dans le milieu liquide le repiquage se fait tous les 30 jours (figure 2.16).

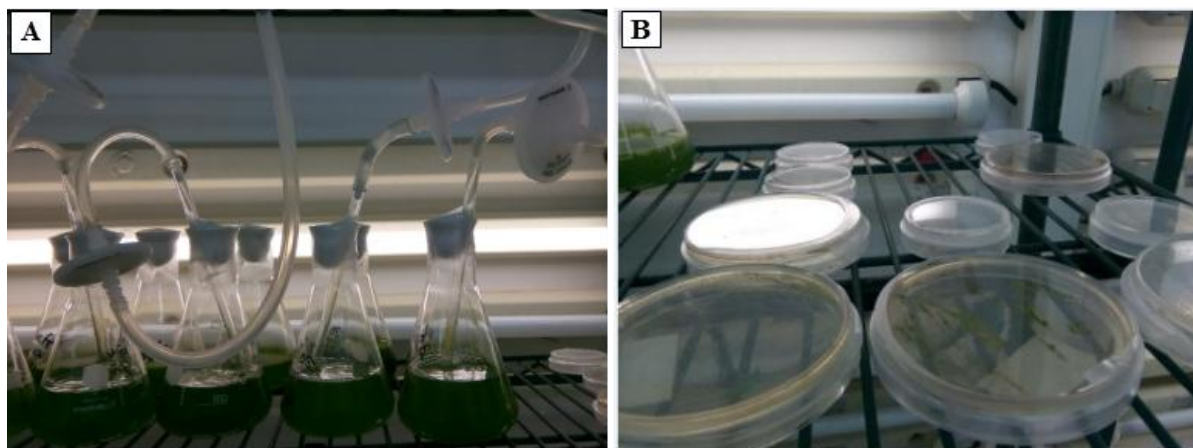


Figure 2.16: Conservation des souches de *Dunaliella* isolées: **(A)** dans un milieu liquide et **(B)** dans un milieu solide (photographie originale).

IV. IDENTIFICATION DES SOUCHES DE *Dunaliella*

IV.1. Activation et adaptation des souches pour la culture en milieux liquides

Afin d'activer les souches, une petite quantité de biomasse est raclée à partir du milieu solide et ensemencée vers un Erlenmeyer de 50 mL contenant 20 mL de milieu liquide. Les Erlenmeyers contenant les souches ont été incubés devant une source lumineuse continue ($120 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), à une température de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, en assurant une agitation de 75 tours/min à l'aide d'un agitateur orbital (Stuart SSL1). Les souches sont contrôlées chaque jour. Lorsqu'elles commencent à pousser, le volume de la culture peut être augmenté à 150 mL (dans un flacon de 250 mL). A ce stade, l'agitation et l'aération peuvent être assurées en faisant barboter du CO_2 (2%) filtré (filtre: $0,2 \mu\text{m}$ PTFE, Gelman, AcroVent) à travers un tube en verre ou en silicone d'un diamètre de 5 mm. La culture est maintenue dans ces conditions durant 10 à 15 jours (qui correspondent à la fin de la phase exponentielle).

Cette étape d'adaptation au milieu liquide a été répétée plusieurs fois pour un rendement meilleur en biomasse, qui est détectable par l'intensité de la couleur verte (qui doit être foncée) à la fin de la phase stationnaire.

IV.2. Etude morphologique des souches de *Dunaliella*

Le milieu de culture utilisé pour l'étude morphologique est le milieu liquide Semenenko-Abdullaev [176], spécifique à *Dunaliella*. Une quantité de 1 mL de chaque souche est transférée aseptiquement dans des Eppendorfs stériles. Une goutte de formol à 4% est ajoutée afin d'immobiliser les cellules et faciliter ainsi la mesure de la taille cellulaire. Après l'ajout du formol, les observations sont faites immédiatement entre lame et lamelle sous microscope (Leica). La taille est mesurée sur 10 à 20 cellules en utilisant le logiciel LAS EZ (Leica DM500).

En plus de la taille et de la forme des cellules, nous avons également observé la présence ou l'absence de paroi et de stigma (forme et nombre) et la production ou non de pigments caroténoïdes. L'identification morphologique a été faite en se référant aux travaux de Massyuk [103], Oren [98] et Borowitzka et Siva [6].

IV.3. Etude moléculaire des souches de *Dunaliella*

IV.3.1. Extraction de l'ADN

Du fait que le genre *Dunaliella* ne possède pas une paroi cellulaire, il n'est pas nécessaire d'appliquer une méthode d'extraction d'ADN très agressive. La méthode utilisée est la méthode Chelex [179].

La résine Chelex 100 (Bio-Rad) est une résine ionique qui lie les composés qui inhibent la PCR; elle est utilisée à un pourcentage de 10%. Un volume de 300 µL de Chelex est réparti dans chaque Eppendorf, puis une partie d'une colonie est ajoutée. La culture doit être uni-algale (pure) et exempte de contamination. Le mélange est agité à l'aide d'un vortex pendant 10 à 15 secondes. Les tubes sont incubés à 95°C pendant 30 min sous agitation continue à l'aide d'un agitateur (Eppendorf Thermomixer confort). Les tubes sont ensuite agités au vortex pendant 10 à 15 secondes, puis centrifugés 5 min à 10 000 rpm. Le surnageant contenant l'ADN est récupéré dans de nouveaux tubes Eppendorfs stériles en évitant de prendre le culot.

IV.3.2. Purification de l'ADN extrait

La purification de l'ADN extrait est réalisée à l'aide d'un kit industriel «Real Clean Spin Kit, RBMCS02. 250 creps». Le protocole utilisé est fourni par le fabricant pour la purification de 300 pb-10 Kb dsDNA.

La purification est basée sur une absorption sélective des acides nucléiques dans des mini-colonnes contenant des membranes en silice.

Un volume de 700 µL d'une solution de solubilisation (réf: CM01) est ajouté à l'ADN extrait. La solution est transférée dans des mini-colonnes mises dans des tubes Eppendorf pour collecter la solution éluée. Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 1 min à 10 000-12 000 rpm. Le filtrat est éliminé et les mini-colonnes sont additionnées de 600 µL de la solution de lavage, laquelle est ensuite centrifugée pendant 1 min à 14 000 rpm. L'opération est répétée deux fois. Un volume de 25 µL de la solution tampon (Réf. E13 du kit « Real Clean Spin Kit RBMCS02. 250 creps) préchauffée à 70°C est ajouté. Les Eppendorfs sont incubés 2 min à 70°C dans un bain Marie, puis centrifugés pendant 1min à 14 000 rpm. A ce stade, l'ADN est prêt à être amplifié par PCR.

IV.3.3. Amplification de l'ADN par PCR

L'amplification par PCR a été effectuée sur la région ITS (Internal Transcribed Spacer) en utilisant les amorces ITS-AB28 et ITS-TW81[180], le gène codant pour l'ARNr 18S (partiel) en utilisant les amorces EUK1A et EUK 516r [181] et enfin le gène rbcL (ribulose-bisphosphate carboxylase) avec les amorces rbcL-17 (rbcL1-20) et rbcL-18 (rbcL 686-665) [182]. L'ITS et le gène rbcL sont les plus utilisés pour l'identification des Chlorophyceae (tableau 2.3).

Tableau 2.3: Noms, séquences et température d'hybridation des amorces utilisées pour l'identification de *Dunaliella*.

Région et gènes amplifiées	Nom des amorces	Séquences	Température d'hybridation °C
ITS	ITS-AB28	GGGATCCGTTTCCGTAGGTGAACCTGC	69,5
	ITS-TW81	GGGATCCATATGCTTAAGTTCAGCGGT	66,6
18S ARNr (partiel)	EUK1A	CTGGTTGATCCTGCCAG	52,9
	EUK 516r	ACCAGACTTGCCCTCC	54,3
Primers Tetra rbcL	rbcL-17	ATGGTTCCACCAACAGAAAAC	55,3
	rbcL-18	TGTGCTTTGTAAATAGCTTCAG	54,7

Un volume de 24 µL du mélange des produits réactionnels de PCR (tableau 2.4) contenant 1 µL d'ADN génomique a été amplifié dans un thermocycleur Bio-Rad. Chaque série d'amplification comporte différentes étapes selon un programme bien déterminé. Tous les éléments nécessaires à la réaction sont regroupés dans un tube PCR qui sera soumis aux différentes températures correspondant à chaque étape. Ces cycles de température sont réalisés automatiquement dans un thermocycleur.

Tableau 2.4: Composition du mélange réactionnel de la PCR.

Réactifs	Volume (µL)
<i>Taq</i> * ADN polymérase	0,125
Tampon	1,875
dNTP** (2,5 mM pour chacune)	2,0
Amorce 1 sens (25 pM)	0,25
Amorce 2 anti-sens (25 pM)	0,25
ddH ₂ O	19,5
ADN	1,0
Volume final	25

* *Taq*: Takara Extaq Hot Start Version, dans 4,5 mM de MgCl.

** dNTP: deoxynucleotide triphosphates.

Le programme commence par une étape de dénaturation de 5 min à 95°C, suivie par une étape d'hybridation à une température spécifique pour chaque système. Les

températures d'hybridation mises au point pour chaque gène utilisé pendant la réaction de la PCR sont mentionnées dans le tableau 2.5. Ces cycles sont suivis d'une étape d'élongation de 5 min à 72°C afin que la polymérase termine la synthèse des brins qu'elle n'a pas eu le temps de finir pendant les cycles précédents.

Tableau 2.5: Programme du thermocycleur pour la région ITS et les gènes 18S et rbcL.

Étapes	ITS		18S		rbcL	
	Conditions	Cycles	Conditions	Cycles	Conditions	Cycles
Dénaturation	95°C – 5 min	1x	95°C – 5 min	1x	95°C – 5 min	1x
Hybridation	95°C – 1 min	35x	95°C – 30 sec	35x	95°C – 30 sec	35x
	52°C – 1 min		53°C – 30 sec		55°C – 30 sec	
	72°C – 1 min		72°C – 40 sec		72°C – 40 sec	
Elongation	72°C – 5 min	1x	72°C – 5 min	1x	72°C – 5 min	1x
	12°C - ∞	1x	12°C - ∞	1x	12°C - ∞	1x

IV.3.4. Électrophorèse sur gel d'agarose

Les produits PCR doivent être visualisés afin de vérifier l'efficacité de l'amplification des ADN étudiés. Un marqueur de poids moléculaire de 100-2642 pb a été employé. Pour cela, 4 µL du tampon de chargement, contenant 1 µL de SG (SYBR Green I) et 999 µL de TE (Tris-EDTA) dont la composition chimique est mentionnée en annexe 2, sont mélangés avec 4 µL de produit d'amplification. Ils sont ensuite déposés lentement dans les puits qui se trouvent sur le gel d'agarose du côté de la cathode selon l'ordre des échantillons dans les tubes PCR. Un marqueur de poids moléculaire connu est mélangé à 4 µL du tampon de chargement, puis déposé en parallèle avec les échantillons. Le gel d'agarose est recouvert par le tampon TAE 1X (Tris-acide acétique glacial-EDTA) (composition en annexe 2), de telle manière à assurer un contact entre l'anode et la cathode. L'électrophorèse est démarrée à 100 V, 400 mA, 250 W et dure 30 min. Cette durée dépend toutefois de la taille des fragments amplifiés (figure 2.17). A la fin de l'électrophorèse, le gel est visualisé à l'aide d'une lampe UV (Gene Flash Bio Imaging, Syngene).

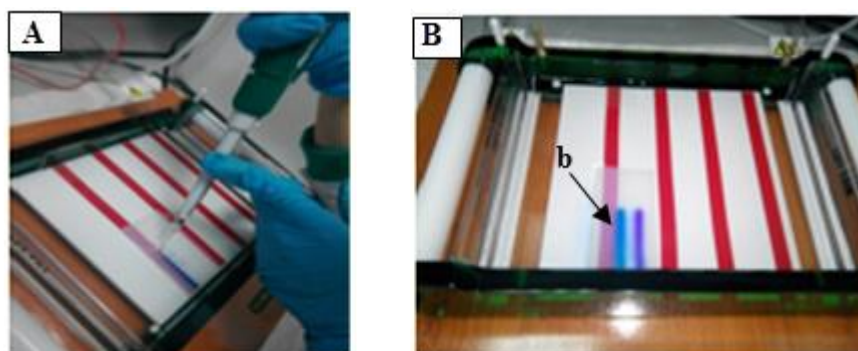


Figure 2.17: Electrophorèse sur gel d'agarose (photographie originale). **(A)** chargement des échantillons dans les puits du gel et **(B)** apparition des bandes «b», à la fin de l'électrophorèse.

Après l'électrophorèse, une étape de purification est nécessaire pour éliminer tous les réactifs utilisés lors de la PCR (primers, *Taq*, etc.) et garder uniquement l'ADN amplifié. La méthode de purification utilisée pour cette partie est une méthode enzymatique. L'enzyme utilisée est « Illustra ExoProStar 1-Step » de GE Healthcare life Sciences. Dans un tube Eppendorf, 1 μL de l'enzyme est mélangé avec 10 μL du produit PCR, le tout étant mis dans un thermocycleur pendant 30 min à une température de 37°C, puis 15 min à 80°C.

IV.3.5. Séquençage

Le séquençage des fragments d'ADN a été effectué selon la méthode de Sanger *et al.* [183] au niveau du laboratoire de la société Macrogen (Corée), en utilisant un séquenceur automatique de type ABI PRISM 3730xl (Applied Biosystems, CA, USA).

IV.3.6. Etudes phylogénétiques

Les séquences sont alignées et corrigées en utilisant le logiciel BioEdit version 7 et MEGA version 6 [184, 185]. Elles sont par la suite comparées et alignées avec les séquences des autres souches qui se trouvent dans la base de données BLAST (NCBI), en utilisant l'algorithme ClustalW dans MEGA 6.

L'arbre phylogénétique est construit en utilisant les paramètres de distance Tamura-Nei et la méthode du neighbor-joining [186]. La topologie de l'arbre a été évaluée par l'analyse du bootstrap avec 1000 répétitions.

IV.4. Test de caroténogenèse

IV.4.1. Conditions de culture des souches en phase de croissance

Dans cette partie deux souches ont été choisies, DunaDZ1 et DunaDZ4, afin de tester leur capacité à produire des pigments caroténoïdes.

Des cultures liquides des souches DunaDZ1 et DunaDZ4 en phase verte (phase de croissance) ont été maintenues dans 150 mL du milieu Semenenko-Abdullaev. Elles sont incubées à une température de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, une intensité lumineuse de $120 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ et une salinité (NaCl) de 1 M. L'agitation est assurée en faisant barboter du CO_2 filtré (2%) à l'intérieur de la culture. Quand la culture atteint un maximum de croissance (donc un maximum de biomasse), elle va servir d'inoculum pour le test de caroténogenèse (phase de stress).

IV.4.2. Caroténogenèse et dosage des pigments caroténoïdes par HPLC

L'élimination de la source de nitrate du milieu de culture et une forte intensité lumineuse sont les facteurs de stress employés dans cette étape. Ces facteurs de stress ont été utilisés par plusieurs chercheurs [10, 118, 187, 188]. Le nitrate et la lumière sont considérés comme des éléments indispensables à la croissance des micro-algues. L'absence de nitrate et une forte intensité lumineuse déclenchent le stress chez les micro-algues, et par conséquent, le déclenchement de la caroténogenèse (pour les micro-algues qui en sont capables, comme par exemple *Dunaliella*).

Un volume de 150 mL de la culture en phase verte (poussant sur milieu Semenenko-Abdullaev) a été centrifugé dans des flacons stériles à 5000 rpm pendant 8 min. Le surnageant a été éliminé et le culot est récupéré dans 150 mL du même milieu de culture mais sans addition d'une source de nitrate.

Les cultures sont incubées dans une chambre contrôlée à 22°C et à une intensité lumineuse deux fois plus forte ($290 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) que celle employée lors de la phase de croissance. Cette intensité est fournie par des lampes blanches. Les cultures sont aérées par du CO_2 à 2% (filtré) et contrôlées tous les jours afin de détecter le virage de la couleur verte à l'orange (signe de caroténogénèse).

La production de pigments caroténoïdes fait partie de l'identification des souches du genre *Dunaliella*.

L'extraction des pigments caroténoïdes a été effectuée à froid et à l'abri de la lumière pour éviter leurs dégradation. Le solvant utilisé est le méthanol à 100%. La méthode est celle de Wellburn [189] qui sera décrite ultérieurement.

L'identification et le dosage des pigments caroténoïdes à la fin de la phase de stress ont été effectués par chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette diodes HPLC-DAD (Agilent 1200 Infinity Series) et équipée par une colonne de type YMC C30 (4,6 mm \times 15 cm \times 3 μm). Les phases mobiles utilisées sont le méthanol, l'acétone pur et l'acétone à 10% dans l'eau distillée (v/v). Les pigments caroténoïdes sont élués à un débit de 1,2 mL/min en utilisant le gradient de solvants mentionné dans le tableau 2.6. Le volume d'injection est de 50 μL .

Tableau 2.6. Gradient de solvants utilisés pour l'analyse HPLC.

Temps (min)	Solvant %		
	Méthanol	Acétone	Acétone 10% aq (v/v)*
0	86	11	3
30	86	11	3
33	3	87	10
46	7	93	0
49	100	0	0
51	86	11	3
55	86	11	3

* Acétone à 10% dans l'eau distillée.

V. CROISSANCE DE LA SOUCHE DUNADZ1 A DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE NaCl

V.1. Cinétique de croissance par comptage cellulaire

La souche de *Dunaliella* DunaDZ1 est cultivée dans des Erlenmeyers de 500 mL contenant 250 mL du milieu Semenenko-Abdullaev à différentes concentrations de NaCl à savoir, 1; 1,5; 2; 3 et 4 M (figure 2.18). La culture a été initiée avec un inoculum de 15 mL d'une culture mère de couleur vert foncé. L'incubation a été faite à une température de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ et à une intensité lumineuse de $120 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, avec un suivi quotidien de la croissance cellulaire par le comptage des cellules et le dosage des pigments chlorophylliens (a et b) et caroténoïdes et cela durant 9 jours.

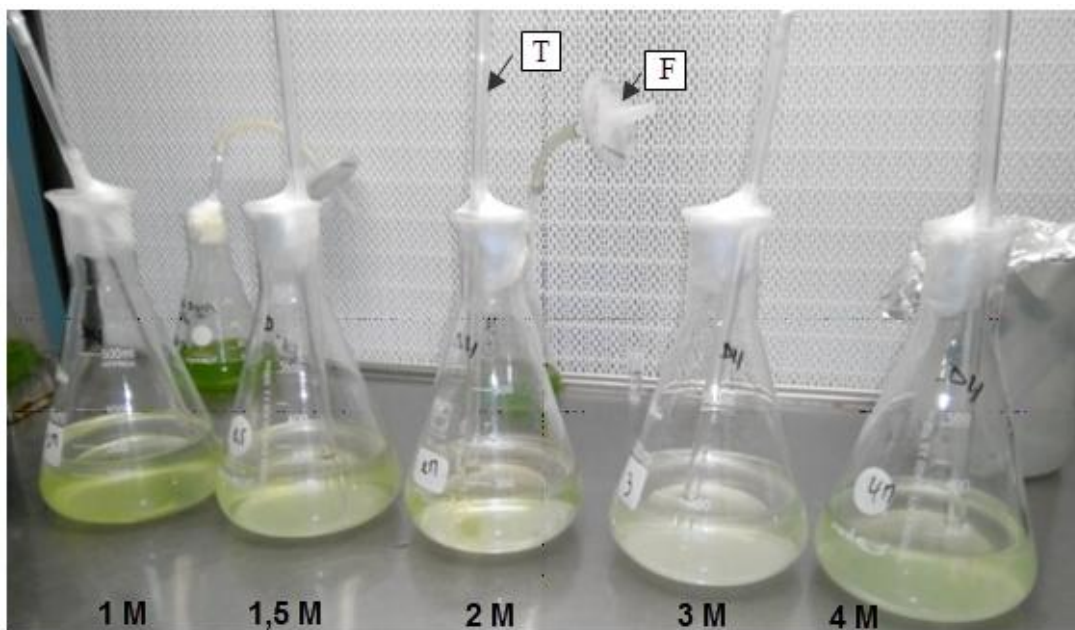


Figure 2.18: Culture de la souche *D. salina* DunaDZ1 à différentes concentrations de NaCl (photographie originale).

T: tube en verre et F: filtre à air (porosité de $0,2 \mu\text{m}$).

Le comptage cellulaire est réalisé sous microscope optique en utilisant la cellule de Neubauer (G 400). Un quadrillage gravé sur la cellule permet un comptage aisé (annexe 3). Avant le comptage, une goutte de formol à 4% est ajoutée à la culture afin d'immobiliser les cellules. Ces dernières sont introduites dans la chambre de comptage. Cinq comptages sont réalisés pour obtenir une moyenne et un écart-type.

V.2. 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 utilisée est celle de Wellburn [189] 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, 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 et à 4°C afin d'éviter la dégradation des pigments. Néanmoins, un bain d'ultrasons a été parfois utilisé car il peut augmenter le rendement de l'extraction, la température du bain étant maintenue la plus basse possible par un bloc de glace. 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 un spectrophotomètre UV-visible de type Helios Unicam en utilisant le logiciel Aurora Scan. Les formules appliquées sont celles de Wellburn [189]:

$$\text{Chl a} = 15,65 \times (A666) - 7,34 \times (A653)$$

$$\text{Chl b} = 27,05 \times (A653) - 11,21 \times (A666)$$

$$\text{PCT}^* = (1000 \times A470 - 2,86 \times \text{Chl a} - 129,2 \times \text{Chl b})/221$$

* Pigments caroténoïdes totaux

Les résultats sont exprimés en µg/mL.

VI. PRODUCTION DE PIGMENTS CAROTENOÏDES DANS DES CONDITIONS DE STRESS

Afin de déterminer le facteur de stress qui conduit à une meilleure teneur en pigments caroténoïdes totaux, différentes conditions de stress ont été testées dans deux milieux de culture, le milieu Johnson et le milieu f/2.

VI.1. Phase de croissance (phase verte)

Pour une meilleure accumulation des pigments caroténoïdes, la croissance en deux phases a été adoptée. La première phase est la phase d'accumulation de la biomasse qui correspond à la phase de croissance dite « phase verte », laquelle se déroule dans des conditions optimales. Au cours de cette phase un maximum de biomasse est obtenu.

Un volume de 20 mL de préculture est inoculé dans des Erlenmeyers de 500 mL contenant 250 mL de chaque milieu (à 1 M de NaCl). Ces cultures sont incubées à $22 \pm 2^\circ\text{C}$ devant une source lumineuse continue, avec un barbotage d'air afin de permettre une agitation. Cette culture va servir pour le test de caroténogénèse. Elle a été suivie par le comptage cellulaire et le dosage des pigments selon les méthodes décrites précédemment.

VI.2. Phase de stress (phase orange): stress dû à une déficience en nitrate, à un stress salin et à un stress dû au cumul des deux facteurs

La phase de croissance est suivie par la phase de stress dite « phase orange » (ou phase de caroténogénèse). C'est au cours de cette phase que la culture a été transférée dans un nouveau milieu en appliquant différents facteurs de stress.

Trois stress sont appliqués: un stress par absence de nitrate, un stress salin en augmentant la teneur en NaCl à 2 M, et un stress dû au cumul de ces deux facteurs à la fois, et cela pour les deux milieux de culture (Johnson et f/2).

Un inoculum de 250 mL à partir de la phase de croissance est centrifugé à 5000 rpm pendant 8 min. Le surnageant est éliminé et le culot est lavé avec le milieu de

culture dans lequel il sera transféré. Le culot est récupéré ensuite dans 150 mL de milieu de culture avec facteurs de stress. L'opération est répétée deux fois pour chaque facteur de stress et chaque milieu de culture.

Les cultures ont été suivies en mesurant les pigments photosynthétiques et les pigments caroténoïdes selon la méthode de Wellburn [189].

VII. INFLUENCE DES METHODES DE RECOLTE DE *Dunaliella salina* DUNADZ1 SUR QUELQUES PARAMETRES NUTRITIONNELS

VII.1. Production de biomasse

Une mise à l'échelle de la culture de la souche *D. salina* DunaDZ1 s'avère possible, après avoir sélectionné les conditions de culture, à savoir le meilleur milieu de culture, la salinité optimale et aussi le facteur de stress qui nous permet d'obtenir une teneur meilleure en pigments caroténoïdes.

La mise à l'échelle est réalisée en multipliant le volume des cultures par un facteur de 4 à 5 à chacune des étapes en passant d'un volume de 50 mL à 250 mL, puis à 1 L, et en dernier, à 20 L (figure 2.19). Ces étapes correspondent à la multiplication algale. Toutes les cultures sont incubées devant une source lumineuse d'intensité $120 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ et à une température avoisinant les 22°C. Le milieu de culture utilisé pour cette étape est le milieu f/2 avec ajustement de la salinité à 1 M.

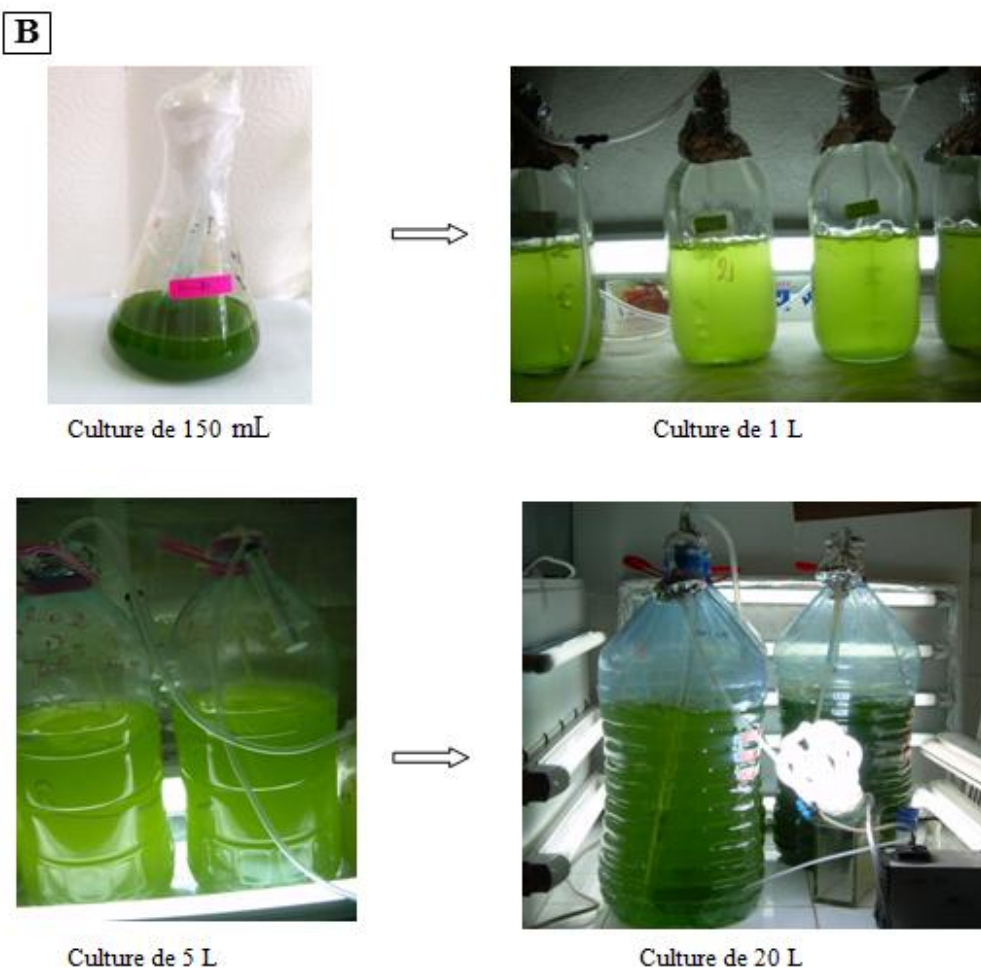
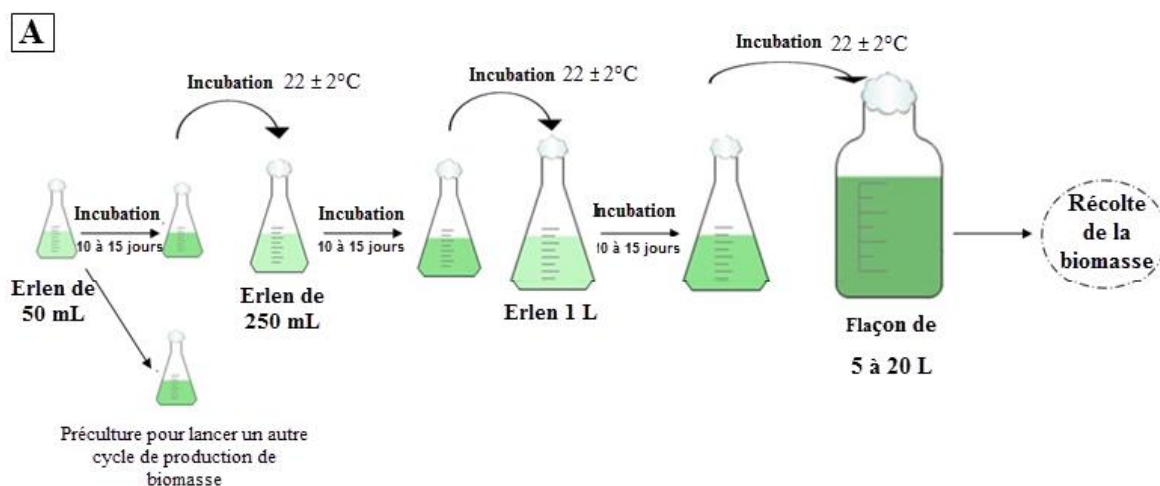


Figure 2.19: Mise à l'échelle* de la culture de la souche *D. salina* DunaDZ1 (photographie originale).

(A) protocole général et (B) illustration du protocole.

* La mise à l'échelle est l'augmentation du volume de la culture par étape et par un facteur de 4 à 5, allant d'un petit volume (50 mL) à un grand volume (20 L).

VII.2. Récolte de biomasse

Deux méthodes de récolte de la biomasse de la souche DunaDZ1 ont été testées, par centrifugation et par floculation en ajustant le pH de la culture. Le volume de la culture utilisé dans cette partie est de 50 mL. L'évaluation de la méthode de récolte a été faite par le calcul de l'efficacité de récupération (E). Les résultats sont exprimés en pourcentage. La méthode de calcul sera décrite ultérieurement.

VII.2.1. Par centrifugation

Les tests de récolte par centrifugation ont été menés sur la culture en phase verte, en faisant varier deux paramètres, à savoir, le nombre de tour par minute et le temps. Six rotations ont été testées: 500, 600, 1000, 1200, 2000 et 2500 rpm et cela pendant 3, 5 et 10 min. Les expériences ont été menées en duplicata. La centrifugeuse utilisée est réfrigérée à 4°C.

L'absorbance à 680 nm est mesurée sur la culture initiale, avant de commencer les tests de récupération par centrifugation. Les meilleures conditions de récolte par centrifugation ont été retenues pour la suite des travaux.

VII.2.2. Par floculation

Cette partie du travail consiste en la modification du pH de la culture afin de déterminer le pH optimal de la récolte de la souche *D. salina* DunaDZ1.

Le pH de la suspension microalgale a été ajusté par l'ajout d'une solution d'acide sulfurique (H₂SO₄) 1 M pour les pH acides, ou par l'ajout d'hydroxyde de sodium (NaOH) pour les pH basiques. Les valeurs de pH testées lors de cette expérience sont: 4; 6,5; 8,5; 10; 10,5; 11,5 et 12.

Un volume précis de la culture a été mis dans des béchers, puis le pH est ajusté sous une agitation continue à l'aide d'un agitateur magnétique. Une fois que le pH voulu est atteint, une agitation vigoureuse est appliquée à 1000 × rpm pendant 5 min, suivie d'une agitation faible de 100 × rpm durant 2 min. Lorsque l'agitation est interrompue, le floc commence à décanter. Afin d'évaluer l'effet de différents pH sur

la récolte de la souche DunaDZ1, l'absorbance à 680 nm du surnageant a été mesurée à différents intervalles de temps: 10, 20, 35, 55, 95 et 140 min.

Après avoir sélectionné le meilleur pH de récolte, la biomasse obtenue à partir de ce traitement a été retenue pour la suite des analyses.

VII.2.3. Efficacité de récupération

Après chaque méthode de récolte, l'efficacité (E) de récupération ou de floculation est évaluée en mesurant l'absorbance à 680 nm de la culture initiale, et celle du surnageant après traitement (centrifugation ou floculation). Cette efficacité est calculée par la formule suivante [58]:

$$E \% = (1 - A/B) \times 100$$

Avec:

A: absorbance à 680 nm du surnageant après traitement.

B: absorbance à 680 nm de la culture initiale avant traitement.

Toutes les biomasses obtenues par différents traitements de récolte ont été lyophilisées dans un lyophilisateur (Chaist) puis conservées à -20°C jusqu'à l'analyse.

VII.3. Analyses des protéines, des carbohydrates et des acides gras

Les biomasses récoltées par centrifugation et par floculation (obtenue par le meilleur pH) ont été analysées en considérant quelques paramètres nutritionnels afin d'évaluer l'effet de la méthode de récolte sur la qualité des biomasses obtenues.

VII.3.1. Protéines

La méthode employée lors du dosage des protéines est la méthode colorimétrique de Lowry *et al.* [190].

Les échantillons sont d'abord traités avec le réactif de Lowry qui est un réactif cuivrique alcalin, qui réagit avec les liaisons peptidiques. Ils sont par la suite traités

avec le réactif phosphotungstomolybdique (réactif de Folin) contenant un mélange complexe de sels inorganiques, lequel réagit avec les résidus tyrosine et tryptophane des protéines en donnant une couleur bleu-vert. L'absorbance du mélange réactionnel est lue à 660 nm.

Le réactif de Lowry est un mélange de trois solutions qui sont préparées séparément puis mélangées avant utilisation avec un ratio de 48:1:1 des solutions A, B et C.

Solution A: Na_2CO_3 à 2% dans NaOH 0,1 N.

Solution B: NaK tartrate tétrahydrate à 1%.

Solution C: CuSO_4 à 0,5%.

Une quantité de 5 mg de biomasse lyophilisée est additionnée de 200 μL d'acide trichloroacétique (TCA) à 24%. Le mélange est placé dans un bain Marie à 95°C pendant 15 min. Après refroidissement, 600 μL d'eau distillée sont ajoutées. Par la suite, le mélange est centrifugé à 1500 x rpm pendant 20 min. Le surnageant est écarté et le culot est resuspendu dans 0,5 mL de réactif de Lowry. Ce mélange est incubé à 55°C pendant 4 h, puis centrifugé de nouveau à 1500 rpm pendant 20 min. Le surnageant peut être conservé à - 20°C jusqu'à l'analyse. Au moment de l'analyse, 100 μL de surnageant sont mis en réaction, dans des tubes Eppendorfs avec 950 μL de réactif de Lowry, puis sont mélangés par inversion.

Après un repos de 10 min à température ambiante, 0,1 mL de réactif de Folin (préparé par une dilution v/v de réactif de Folin 2 N avec de l'eau distillée) est ajouté. Le mélange est vortexé immédiatement. Après 30 min, l'absorbance est lue à 660 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (Jenway 6705). Les teneurs des biomasses en protéines sont déterminées en se référant à une gamme étalon de 0 à 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, préparée à partir d'une solution mère de sérum albumine bovine à 2,5 mg/mL.

VII.3.2. Carbohydrates

La méthode utilisée est celle de Dubois *et al.* [191]. C'est une méthode colorimétrique qui permet la détermination des glucides totaux. Les liaisons glycosidiques des polysaccharides sont hydrolysées à chaud en présence d'acide sulfurique. Les monosaccharides obtenus sont déshydratés pour former du furfural à

partir des pentoses ou hydroxyméthylfurfural à partir des hexoses, lesquels interagissent avec du phénol par condensation pour former des composés de coloration orange-jaune qui absorbent à 490 nm.

Une quantité de 10 mg de biomasse lyophilisée est mise dans des tubes en verre, puis 5 mL d'acide sulfurique à 1 M sont ajoutés. Les tubes sont incubés à 100°C pendant 60 min, puis sont laissés 30 min à température ambiante. Le mélange est centrifugé à 1500 rpm pendant 10 min. Un volume de 2 mL de surnageant est additionné à 1 mL de phénol à 5% et 5 mL de H₂SO₄ concentré. Les tubes sont vortexés immédiatement pendant 10 secondes, puis laissés 30 min à température ambiante. La lecture de l'absorbance se fait à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible à une longueur d'onde de 490 nm.

La quantité de carbohydrates est déterminée à partir d'une gamme étalon de glucose qui est réalisée avec des concentrations allant de 0 à 200 µg/mL. Cette dernière est préparée à partir d'une solution mère d'une concentration de 0,1 mg/mL.

VII.3.3. Acides gras

VII.3.3.1. Extraction des lipides

La méthode employée lors de ce dosage est celle de Bligh et Dyer [192]. C'est une méthode utilisant un mélange de solvants non miscibles dans l'eau. La mixture de solvants est constituée de chloroforme/méthanol dans une proportion bien définie. Cette mixture de solvant de polarité différente, combine l'extraction des lipides à la capacité du méthanol à éclater les cellules de micro-algues et y pénétrer, afin de rendre les lipides accessible au chloroforme.

Une quantité de biomasse lyophilisée de 500 mg est additionnée de 18 mL d'eau distillée. Le tout est mélangé et déposé dans un sonificateur pendant 15 min. Un volume de 20 mL de méthanol est ajouté au mélange qui est mis dans un bain sonificateur pendant 15 min. Par la suite, 40 mL de chloroforme sont ajoutés. Le mélange est laissé au repos pendant 2 min, puis est centrifugé à 4000 rpm pendant 15 min. La phase inférieure est récupérée à l'aide d'une pipette Pasteur. Cette phase correspond au chloroforme contenant les lipides. Pour augmenter le rendement de l'extraction, 40 mL de chloroforme sont ajoutés dans les tubes qui ont été centrifugés

(contenant la biomasse et la phase méthanolique), puis les mêmes étapes sont répétées. Après avoir rassemblé toutes les phases chloroformiques, deux volumes d'une solution d'eau physiologique (9 g de NaCl dans un litre d'eau distillée) sont mélangés à la phase de chloroforme, puis mis à décanter dans une ampoule à décanter. Le mélange est par la suite laissé reposer pendant 30 min, et la phase organique est ainsi récupérée. Par la suite, le chloroforme est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif de type Büchi.

VII.3.3.2. Transméthylation et analyse par chromatographie en phase gazeuse CPG

L'analyse du profil des acides gras est effectuée par CPG après transméthylation. Une masse de lipide d'environ 50 mg est mise en réaction avec 1 mL de H₂SO₄ 6% dans du méthanol. Le mélange est sonifié (sonificateur Transsonic T700) à température ambiante pendant 60 min. Après évaporation du méthanol, les méthylesters sont resuspendus dans 1 mL de chloroforme. L'échantillon est ainsi prêt pour être analysé par CPG.

Les acides gras méthylesters sont identifiés par une chromatographie en phase gazeuse de type Chrompack CP9002, équipée d'une colonne capillaire DB23 (50% cyanopropyl), 30 m × 0,32 mm × 0,25 µm. L'injection de 3 µL de l'échantillon a été faite avec le mode split. La température de l'injecteur est de 250°C. Le gaz vecteur utilisé est l'azote. La température du four est maintenue à 70°C pendant 2 min, puis augmentée progressivement à 220°C avec une marge de 4°C/min. Cette température est maintenue pendant 10 min.

VIII. PROCÉDES D'EXTRACTION DES PIGMENTS CAROTENOÏDES A PARTIR DE *D. salina* DUNADZ1

La mise à l'échelle de la production de biomasse à partir de *D. salina* DunaDZ1 nous a permis de collecter environ 50 g de biomasse orange et environ 40 g de la biomasse verte. Ces quantités ont été utilisées pour l'extraction et la caractérisation des pigments caroténoïdes.

VIII.1. Extraction assistée par ultrasons (UAE)

VIII.1.1. Principe

Les vibrations dues aux ultrasons provoquent la rupture des parois cellulaires, facilitant ainsi la libération du contenu des cellules. L'application des ultrasons accélère l'extraction et permet d'augmenter les rendements [146]. C'est une méthode simple, efficace et peu coûteuse. Les avantages les plus significatifs sont liés à l'augmentation du rendement d'extraction et à l'accélération de la cinétique par rapport à une extraction classique. L'extraction assistée par ultrasons permet d'utiliser une large gamme de solvants afin d'obtenir différents composés naturels.

VIII.1.2. Mode opératoire

Cinq solvants ont été testés dans l'extraction assistée par ultrasons: un mélange de *n*-hexane et d'éthanol (3:4); acétate d'éthyle, isopropanol, acétone et isobutanol, dont les caractéristiques chimiques sont mentionnées dans le tableau cité en annexe 2. Une quantité de 0,5 g de biomasse de *D. salina* a été pesée et mise dans plusieurs vials. Dans chaque vial, un volume de 5 mL de chaque solvant a été ajouté. Les vials sont déposés dans un appareil à ultrason 37 KHz (ultrasonificateur de type Elma brand S 40H, Singen, Allemagne), à une température de 50°C pendant 30 min. Les extraits sont par la suite filtrés, puis concentrés à l'aide d'un évaporateur rotatif de type Heidolph Hei-Vap Value HB/G3 (Allemagne) à 35°C. Les extraits sont par la suite saturés avec de l'azote (N₂) et stockés à 4°C dans l'obscurité jusqu'à l'analyse (figure 2.20). A la fin de chaque extraction le rendement est calculé. Deux répétitions ont été effectuées.

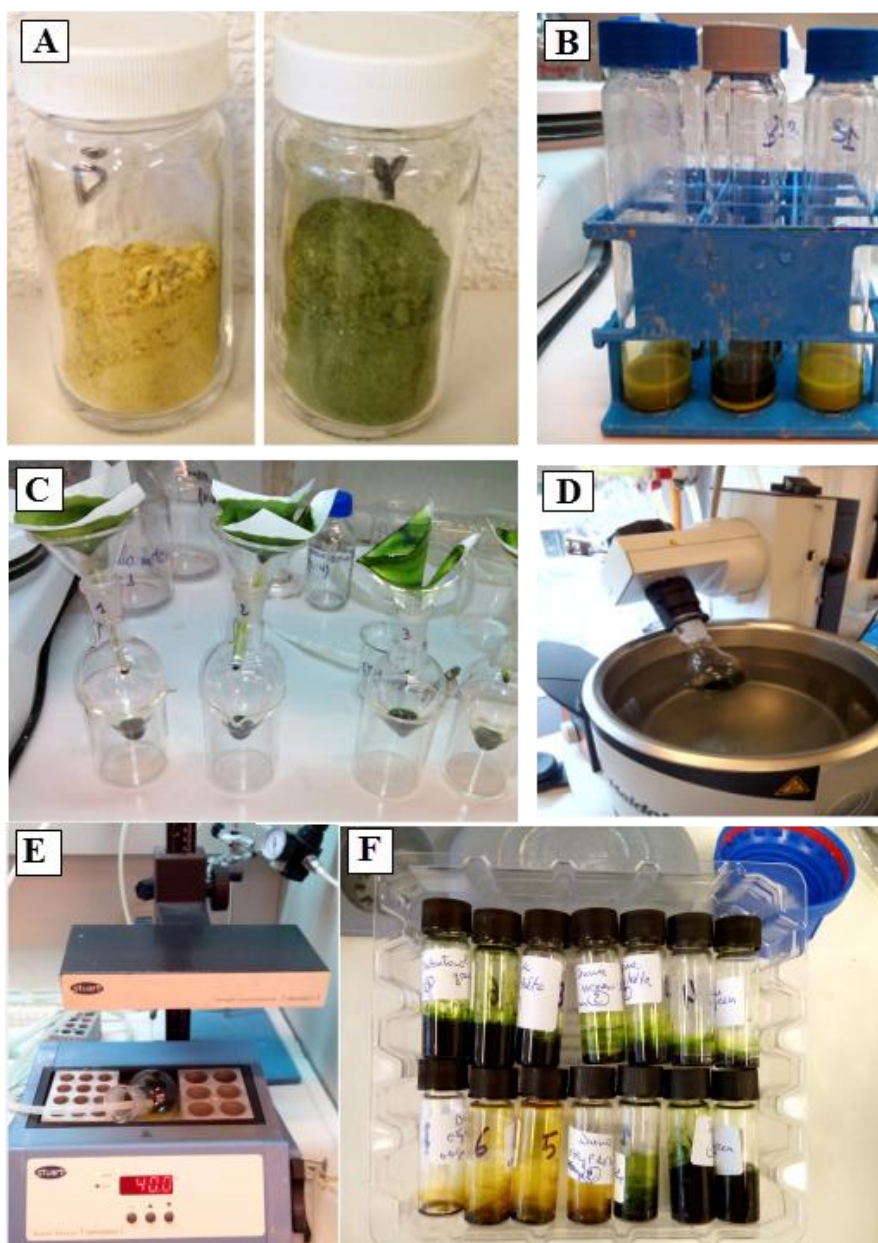


Figure 2.20: Illustration de la méthode d'extraction par ultrasons (photographie originale). **(A)** biomasses verte et orange de *D. salina* DunaDZ1, **(B)** extraits obtenus après traitement par ultrasons, **(C)** filtration des extraits, **(D)** concentration des extraits à l'aide d'un évaporateur rotatif, **(E)** séchage des extraits par l'azote (N_2) et **(F)** extraits secs saturés avec de l'azote.

VIII.2. Extraction par liquide pressurisé (PLE)

VIII.2.1. Principe

L'extraction par liquide pressurisé, appelée aussi extraction accélérée par solvant, est une technique alternative d'extraction consistant en l'utilisation de solvants organiques à température et pression élevées. Ceci qui permet l'augmentation de la température d'ébullition du solvant, augmentant ainsi la solubilité et le transfert de masse par rapport aux techniques effectuées à température et à pression ambiantes. La haute pression appliquée assure le maintien du solvant à l'état liquide à la température appliquée. Les températures élevées d'extraction favorisent le transfert de matière et augmentent les taux d'extraction. Cette technique nécessite généralement moins de temps et présente l'avantage de consommer une faible quantité de solvants organiques par rapport aux techniques conventionnelles [193]. L'extraction par liquide pressurisé peut être considérée comme un processus d'extraction vert, surtout quand le solvant utilisé est non toxique [142].

L'échantillon à extraire est placé dans une cellule en acier (figure 2.21). La cellule est ensuite remplie de solvant d'une manière automatique par l'appareil, puis maintenue sous pression pendant une certaine durée (temps statique) et à une certaine température. Le solvant chargé en métabolites est par la suite collecté. Plusieurs cycles d'extraction peuvent être réalisés sur un même échantillon. Une haute pression et une haute température favorisent la pénétration du solvant dans la matrice, améliorant ainsi le rendement de l'extraction [194].

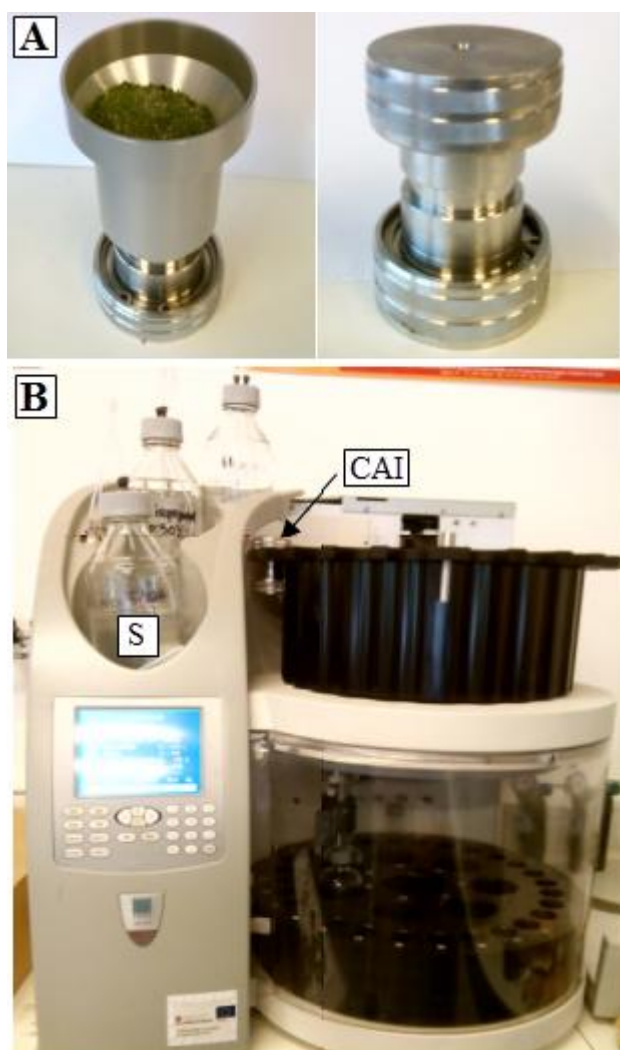


Figure 2.21: Le système d'extraction par liquide pressurisé (photographie originale). **(A)** remplissage de la cellule avec la biomasse sèche et le sable et **(B)** extracteur de type Dunix ASE 350.

CAI: cellule en acier inoxydable; S: solvant.

VIII.2.2. Mode opératoire

L'appareil utilisé est un extracteur Dunix ASE 350 (Sunnyvale, Californie) équipé par des cellules en acier inoxydable d'une capacité de 10 mL (figure 2.21). Une quantité de 1 g de chaque biomasse est mélangée avec 10 g de sable de mer dont la taille des grains est de l'ordre de 300 à 350 μm (Scharlau, Espagne). Les cellules contenant la biomasse sont automatiquement remplies par le solvant. Quatre solvants ont été employés pour l'extraction par liquide pressurisé: l'éthanol, le *n*-hexane, l'acétate d'éthyle et un mélange de *n*-hexane et d'éthanol (3:4).

Les solvants utilisés lors de cette partie sont des solvants recommandés par Prat *et al.* [195], dont la polarité est exprimée dans le tableau cité en annexe 2. L'extraction a été faite à trois différentes températures: 90, 120 et 150°C. Le temps statique de l'extraction est de 15 min pour chaque expérience (un seul cycle a été réalisé). La pression est fixée à 1600 PSI (110,32 bar) tout au long de l'extraction.

Avant le début de l'extraction, la cellule contenant la biomasse est chauffée pendant un temps donné; ce temps dépend de la température d'extraction, cette durée est fixée automatiquement par l'appareil. Elle est de 5 min quand la température d'extraction est de 90 et 120°C et 7 min quand la température est de 150°C. Toutes les extractions ont été effectuées en double.

Les différentes étapes d'extraction, effectuées automatiquement par l'appareil, sont les suivantes: (a) la cellule est remplie par le solvant jusqu'à atteindre une pression de 1600 PSI; (b) la cellule est chauffée jusqu'à la température d'extraction voulue; (c) temps statique, lors de cette étape toutes les conditions sont stables et cela durant 15 min; (d) rinçage de la cellule en utilisant le solvant d'extraction; (e) l'extrait est purgé de la cellule en utilisant l'azote (N₂) et (f) la pression diminue, pour indiquer la fin de l'extraction. Entre chaque extraction un rinçage complet du système est effectué. Par la suite, les extraits sont évaporés sous une atmosphère saturée en azote, puis stockés à 4°C jusqu'à l'analyse. A la fin de chaque extraction le rendement est calculé.

VIII.3. Caractérisation des extraits par des méthodes chromatographiques

VIII.3.1. Chromatographie sur couche mince (CCM) des extraits

Des feuilles d'aluminium prêtes à l'emploi, contenant une couche de 0,20 mm de silice 60 (Macherey-Nagel, Allemagne) ont été employées pour réaliser la CCM. La phase mobile utilisée lors de cette chromatographie est un mélange d'éther de pétrole et d'acétone à une proportion de 3:1 (v/v).

Tous les extraits obtenus par différentes techniques d'extraction à partir des phases, verte et orange de *D. salina*, ont été solubilisés dans le chloroforme à une concentration de 20 mg/mL. Le standard utilisé est le β -carotène à une concentration

de 5 mg/mL dans le chloroforme. Un volume de 10 μ L de chaque extrait est déposé sur la plaque de CCM. La plaque est maintenue en position verticale dans une cuve remplie par une quantité de solvant (phase mobile). Les différents constituants des extraits sont entraînés par capillarité vers le haut de la plaque.

A la fin de la CCM, la plaque est retirée, puis les spots obtenus seront révélés. Chaque spot obtenu est caractérisé par son rapport frontal (Rf) dont la formule est:

$$Rf = d/D$$

Avec:

d: distance parcourue par le constituant (spot).

D: distance parcourue par l'éluant (phase mobile).

VIII.3.2. Analyses chromatographiques des extraits par HPLC

Le dosage des pigments caroténoïdes des extraits obtenus par différents solvants utilisant les deux méthodes d'extractions (par ultrasons et par liquides pressurisés) a été effectué par HPLC-DAD de type Varian Prostar 218. Vingt microlitres de chaque extrait à 2 mg/mL sont injectés dans l'appareil HPLC qui est équipé d'une colonne Eclipse XDB C18 (150 \times 4,6 mm; granulométrie 5 μ m). La phase mobile utilisée est le méthanol à 100%. Les pigments sont élus à un débit de 1,5 mL/min pendant 50 min. Différentes concentrations en β -carotène (0,075; 0,125; 0,25; 0,5 et 1 mg/mL) sont utilisées pour tracer la courbe d'étalonnage. La surface des pics des pigments obtenus est utilisée pour évaluer la concentration de ces derniers dans chaque extrait. La longueur de détection est de 450 nm.

VIII.4. Evaluation *in vitro* de l'activité antioxydante des extraits

L'activité antioxydante est évaluée par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) suivant la méthode de Tepe *et al.* [196]. Le DPPH sous sa forme oxydée est un radical libre et stable. Il possède une coloration violette (foncée) mais sa couleur vire au jaune lorsqu'il est réduit.

Un volume de 1 mL de chacune des dilutions des extraits (300 à 1000 µg/mL) est mélangé dans un tube en verre avec un même volume d'une solution méthanolique de DPPH (0,004%). Après 30 min d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est lue à 517 nm. Trois répétitions ont été effectuées. L'activité antioxydante des échantillons est exprimée par le pourcentage d'inhibition (I%) du DPPH, lequel est calculé par la relation suivante:

$$I \% = [(A_0 - A_e)/A_0] \times 100$$

Avec:

A₀: absorbance du DPPH en absence de l'extrait (1 volume DPPH + 1 volume méthanol).

A_e: absorbance du mélange de l'extrait avec le DPPH (1 volume de l'extrait + 1 volume DPPH), après 30 min.

Le blanc est un mélange de l'extrait avec le méthanol (1 volume de l'extrait + 1 volume méthanol).

La concentration de l'extrait nécessaire pour piéger 50% de radicaux libres (DPPH) est calculée par régression linéaire des pourcentages d'inhibition calculés en fonction des différentes concentrations des extraits.

IX. ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DE LA SOUCHE DUNADZ1

La méthode utilisée est la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé. Elle permet de déterminer l'action des extraits de la micro-algue sur différentes souches microbiennes. Cette action se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition du microorganisme autour du disque préalablement imprégné de l'extrait.

IX.1. Souches microbiennes utilisées et milieu de culture

Les souches de bactéries utilisées dans cette étude sont *Staphylococcus aureus* MRSA 639c, *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 et *Bacillus subtilis* ATCC 6633, qui sont des bactéries à Gram positif. Des bactéries à Gram négatif ont aussi été utilisées, *Escherichia coli* E52, *Pseudomonas aeruginosa* IPA1 et *Salmonella enterica* serovar Typhi ATCC 14028. Les souches de levure et de champignons filamenteux utilisées sont *Candida albicans* M3, *Aspergillus carbonarius* M333, *Fusarium culmorum* FC1 et *Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829. Le milieu de culture utilisé est la gélose nutritive glucosée (annexe 1).

IX.2. Extraction et détermination de l'activité antimicrobienne

Les biomasses verte (phase de croissance) et orange (phase de production des pigments caroténoïdes) ont été testées pour leur effet antimicrobien. Quatre solvants ont été employés, à savoir l'eau, le chloroforme, le méthanol et l'éthanol. Une quantité de biomasse de 0,25 g est additionnée de 50 mL de solvant. L'extraction est effectuée à l'obscurité dans un shaker, sous agitation continue de 250 rpm et à une température de 45°C. Après 24 h d'incubation, les extraits ainsi obtenus ont été filtrés, puis les solvants ont été évaporés à l'aide d'un rotavapor (Büchi) (figure 2.22). L'extrait sec obtenu est dissout dans 0,5 mL de chaque solvant.

A l'aide d'une microseringue, un volume de 20 µL de chaque extrait est déposé sur des disques en papier Whatman stérile (diamètre: 6mm) puis stérilisés sous lampe UV pendant 75 min. Les disques, une fois stérilisés, sont déposés à l'aide d'une pince stérile, près du bec Bunsen, sur le milieu de culture préalablement ensemencé avec 150 µL de la suspension microbienne (pour 100 mL de milieu de culture). La suspension microbienne est préparée dans des tubes à essai contenant l'eau physiologique. Les boîtes de Pétri sont par la suite incubées à 30°C pendant 24

h pour les bactéries et la levure et 48 h pour les champignons filamenteux. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés en millimètres en comptabilisant celui du disque qui est de 6 mm.

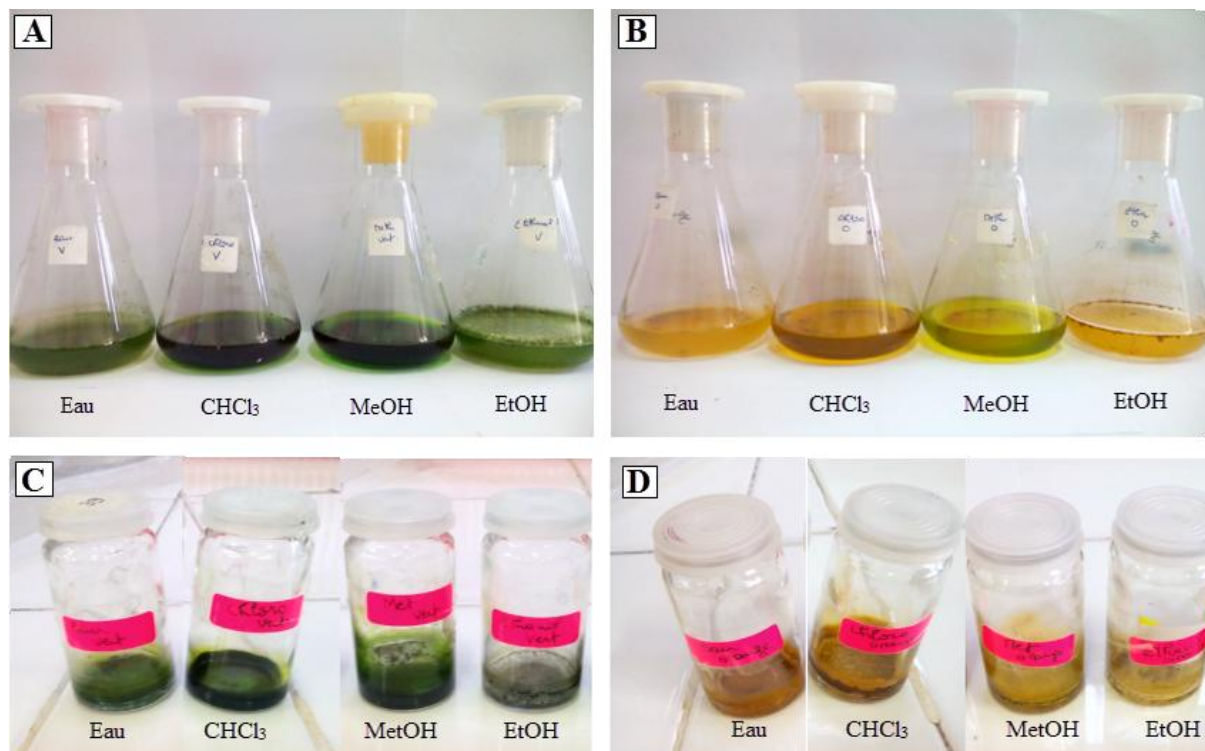


Figure 2.22: Les extraits obtenus après une incubation à 45°C, pendant 24 h (photographie originale). A partir des biomasses verte **(A)** et orange **(B)**. Extraits secs obtenus à partir des biomasses verte **(C)** et orange **(D)**.

Eau: extrait aqueux; **CHCl₃:** extrait chloroformique; **MeOH:** extrait méthanolique; **EtOH:** extrait éthanolique.

CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION

I. CARACTERISTIQUES PHYSICOCHIMIQUES DES EAUX

Les résultats des analyses physicochimiques des eaux prélevées au niveau des sebkhas d'Oran, d'Arzew, de Zahrez Chergui et de Zahrez Gherbi, sont présentés dans le tableau 3.7.

Les eaux des sebkhas d'Oran et d'Arzew sont incolores. Cependant, celles provenant des différents sites de la sebkha de Zahrez Chergui (Sidi Ameur) ont une couleur caractéristique, allant du rose au brunâtre, et celles de Zahrez Gherbi, une couleur grisâtre. Les eaux de la sebkha d'Oran et de Zahrez Chergui ont des pH voisins de la neutralité (7,2 et 7,3, respectivement). En revanche, la sebkha d'Arzew a un pH basique (8,3). Le pH de l'eau de mer utilisée pour la préparation du milieu de culture f/2, est également basique (8,2).

Les valeurs de la salinité sont très variables d'une eau à une autre, allant de 22,4‰ pour la sebkha d'Arzew à 325‰ pour celle de Zahrez Chergui. La conductivité électrique la plus élevée a été enregistrée pour les eaux de Zahrez Chergui, avec une valeur de 135,6 mS/cm, suivie par celle d'Oran 65,4 mS/cm. Les conductivités électriques des eaux de la sebkha d'Arzew et de l'eau de mer sont très proches: 45,6 et 43,4 mS/cm, respectivement.

L'élément majoritaire présent dans toutes les eaux est le chlorure avec une valeur minimale pour la sebkha d'Arzew (11,3 g/L) et une valeur maximale largement supérieure à la précédente pour la sebkha de Zahrez Chergui (158 g/L). Cette dernière est riche en sodium et en sulfate, comparativement aux autres sebkhas étudiées; les valeurs sont de 40,25 et 24,7 g/L, respectivement. Il est à signaler que le taux de magnésium de Zahrez Chergui est plus élevé (2,75 g/L) par rapport à celui des autres sebkhas. Pour les sebkhas d'Oran et d'Arzew, les autres éléments présents dans les eaux sont (par ordre décroissant): $\text{Na}^+ > \text{SO}_4^{2-} > \text{K}^+ > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$.

Tableau 3.7: Caractéristiques physicochimiques des eaux des différentes sebkhas étudiées.

Paramètres	Eau de la Sebkha d'Oran	Eau de la Sebkha d'Arzew	Eau de Zahrez Chergui	Eau de mer
Couleur	Incolore	Incolore	Rose à brunâtre	Incolore
pH	7,2	8,3	7,3	8,2
Salinité (‰)	38,9	22,4	325	35,3
Conductivité électrique (mS/cm)	65,4	45,6	135,6	43,4
SO ₄ ²⁻ (g/L)	4,26	5,94	24,7	2,46
Cl ⁻ (g/L)	38,9	11,3	158	21,6
Ca ²⁺ (g/L)	0,43	0,42	0,85	0,7
Mg ²⁺ (g/L)	0,14	0,13	2,75	0,3
Na ⁺ (g/L)	17	6,6	40,25	8,9
K ⁺ (g/L)	3,3	3,3	0,12	0,57

II. SOUCHES DE *Dunaliella* ISOLEES

L'isolement des micro-algues du genre *Dunaliella* a été effectué sur milieu solide. Les colonies de micro-algues commencent à apparaître dès la première semaine d'incubation sur les trois milieux de culture testés (f/2, Johnson et Semenenko-Abdullaev), contenant différentes concentrations de NaCl (1, 2 et 3 M).

Les souches de *Dunaliella* qui sont isolées de différentes régions sont représentées dans le tableau 3.8. En se basant sur l'observation macroscopique et microscopique, 26 isolats ont été récoltés, comme cela est indiqué ci-dessous.

- **Sebkha d'Oran:** les isolats ressemblant à *Dunaliella* n'ont pratiquement pas été observés. De ce fait, un seul isolat dont la morphologie des cellules est un peu proche de celle de *Dunaliella* a été collecté.
- **Sebkha d'Arzew:** absence de micro-algues ressemblant au genre *Dunaliella*.
- **Zahrez Chergui:** 16 isolats ont été récoltés de trois sites différents, 7 provenant du site S1, 4 du site S2 et 5 du site S3.

- **Zahrez Gherbi:** 9 isolats dont 5 proviennent du site S4, 3 du site S5 et 1 du site S6 ont été récoltés.

La plupart des souches isolées à partir des deux Zahrez ont une couleur orange et ressemblent très fortement à *Dunaliella*. Cependant, certains autres sont de couleur verte.

Tableau 3.8: Souches de micro-algues isolées et leur origine.

Région	Site	Souches isolées
Oran	-	TC1
Arzew	-	-
Zahrez Chergui (Sidi Ameer)	S1	DunaDZ1, DunaDZ2, DunaDZ5, DunaDZ6, DunaDZ7, DunaDZ8, DunaDZ9.
	S2	DunaDZ4, DunaDZ10, DunaDZ11, DunaDZ12.
	S3	DunaDZ3, DunaDZ13, DunaDZ14, DunaDZ15, DunaDZ16.
Zahrez Gherbi	S4	DunaDZ17, DunaDZ18, DunaDZ19, DunaDZ20, DunaDZ21.
	S5	DunaDZ22, DunaDZ23, DunaDZ24.
	S6	DunaDZ25.

III. TAXONOMIE DES SOUCHES DE *Dunaliella*

III.1. Résultats

III.1.1. Caractéristiques morphologiques

III.1.1.1. Macromorphologie

Après dix jours d'incubation, tous les isolats ont présenté une bonne croissance sur le milieu Semenenko-Abdullaev solide, une croissance moyenne sur le milieu f/2 et une croissance faible sur le milieu Johnson. Les colonies apparaissent rondes et luisantes, d'un diamètre allant de 0,5 à 3 mm. Elles sont de couleur vert foncé ou

clair, comme elles peuvent apparaître aussi orange clair ou foncé. Il est à noter que la couleur des colonies dépend des conditions de culture. Les colonies sont observées au microscope optique avant sélection (figure 3.23).

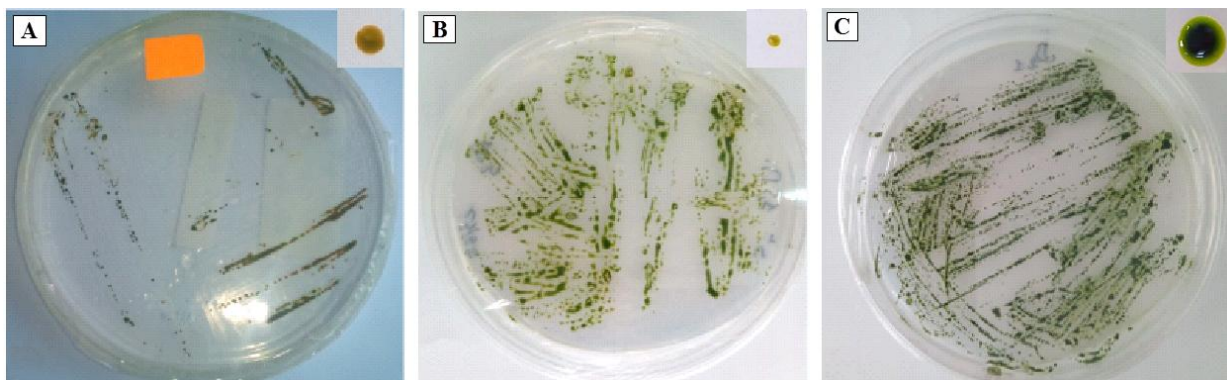


Figure 3.23: Macromorphologie des souches ensemencées en stries: **(A)** DunaDZ1, **(B)** DunaDZ10 et **(C)** DunaDZ12, cultivées sur le milieu Semenenko-Abdullaev à 1 M de NaCl (photographie originale).

III.1.1.2. Micromorphologie

Les vingt six souches isolées ont été classées dans 5 groupes en se basant sur la macromorphologie et la micromorphologie, chacun d'eux étant homogènes du point de vue morphologique: groupe 1 (17 isolats), groupe 2 (3 isolats), groupe 3 (4 isolats), groupe 4 (1 isolat) et groupe 5 (1 isolat).

Une étude morphologique détaillée a été entreprise sur 5 isolats représentatifs de chacun des 5 groupes: DunaDZ1 (groupe 1), DunaDZ2 (groupe 2), DunaDZ3 (groupe 3), DunaDZ4 (groupe 4) et TC1 (groupe 5). Cette étude a été effectuée sur des souches cultivées sur le milieu liquide Semenenko-Abdullaev à une salinité de 1 M. Le tableau 3.9 regroupe les critères morphologiques de ces 5 souches. Cette étude micromorphologique a été menée en se référant au guide de Borowitzka et Siva [6]. Vingt cinq souches sont assignées au genre *Dunaliella*, tandis que la souche TC1 s'est révélée appartenir au genre *Tetraselmis*, qui est un genre qui présente des critères morphologiques proches de ceux de *Dunaliella*.

Les cellules de *Dunaliella* présentent une variabilité morphologique. Elles peuvent être ovoïdes ou sphériques selon les conditions de culture (figure 3.24). Les

cellules de la souche DunaDZ1, représentative du groupe 1, se présentent sous forme ovoïdes. La taille cellulaire est de $17,2 \pm 0,1 \mu\text{m}$ pour la longueur et de $11,5 \pm 0,3 \mu\text{m}$ pour la largeur. Les souches sont mobiles à l'aide de deux flagelles, à l'exception de la souche DunaDZ2 (groupe 2) dont les cellules sont regroupées sous forme d'agrégats non mobiles, dont la taille des cellules est de $5,5 \pm 1,8 \mu\text{m}$ pour la longueur et de $4,8 \pm 1,2 \mu\text{m}$ pour la largeur. Ce stade est appelé « *palmella* » et peut être développé lorsque les cellules sont exposées à des conditions extrêmes, comme la salinité [197] et le stress oxydatif [198]. Selon Borowitzka et Siva [6], ce stade peut être causé par une salinité réduite, inférieure à 10% de NaCl. Quand la salinité est environ de 20% les cellules reforment leurs flagelles et deviennent à nouveau mobiles. Plusieurs auteurs ont remarqué ce changement de forme chez les micro-algues du genre *Euglena*, *Chlamydomonas*, *Dunaliella* et *Pediastrum* [82, 199]. La déficience en nutriments et une basse température peuvent aussi déclencher ce stade [6].

Les cellules de la souche DunaDZ3 (groupe 3) sont ellipsoïdes et possèdent un stigma qui est un critère d'identification chez le genre *Dunaliella*. Ce stigma se présente sous forme d'une tâche rougeâtre à l'extrémité apicale de la cellule et joue un rôle de photorécepteur. Les cellules de la souche DunaDZ4 (groupe 4) sont de forme ovoïde à sphérique, avec présence de deux flagelles et absence de stigma.

Les cellules de la souche TC1, qui est l'unique représentant du groupe 5, sont ellipsoïdes et possèdent quatre flagelles. La taille cellulaire est de $20,7 \pm 1,3 \mu\text{m}$ pour la longueur et de $13,2 \pm 1,9 \mu\text{m}$ pour la largeur. Les cellules possèdent un stigma.

Tableau 3.9: Caractéristiques micromorphologiques des 5 souches représentatives des groupes: 1, 2, 3, 4 et 5.

Souches	Forme cellulaire	Longueur cellulaire (μm)	Largueur cellulaire (μm)	Stigma**	Couleur des cellules
DunaDZ1	Ovoïde	17,2 \pm 0,1	11,5 \pm 0,3	Absence	Verte/orange
DunaDZ2	<i>Palmella*</i>	5,5 \pm 1,8	4,8 \pm 1,2	Absence	Verte
DunaDZ3	Ellipsoïde	14,6 \pm 1,7	6,9 \pm 1,3	Présence d'un seul stigma	Verte
DunaDZ4	Ovoïde à sphérique	15,8 \pm 0,9	10,2 \pm 1,2	Absence	Verte
TC1	Ellipsoïde	20,7 \pm 1,3	13,2 \pm 1,9	Présence d'un seul stigma	Verte

***Palmella:** stade de croissance qui consiste en l'agrégation des cellules qui deviennent non mobiles.

****Stigma:** tâche rouge se trouvant à l'extrémité apicale de la cellule et jouant un rôle de photorécepteur.

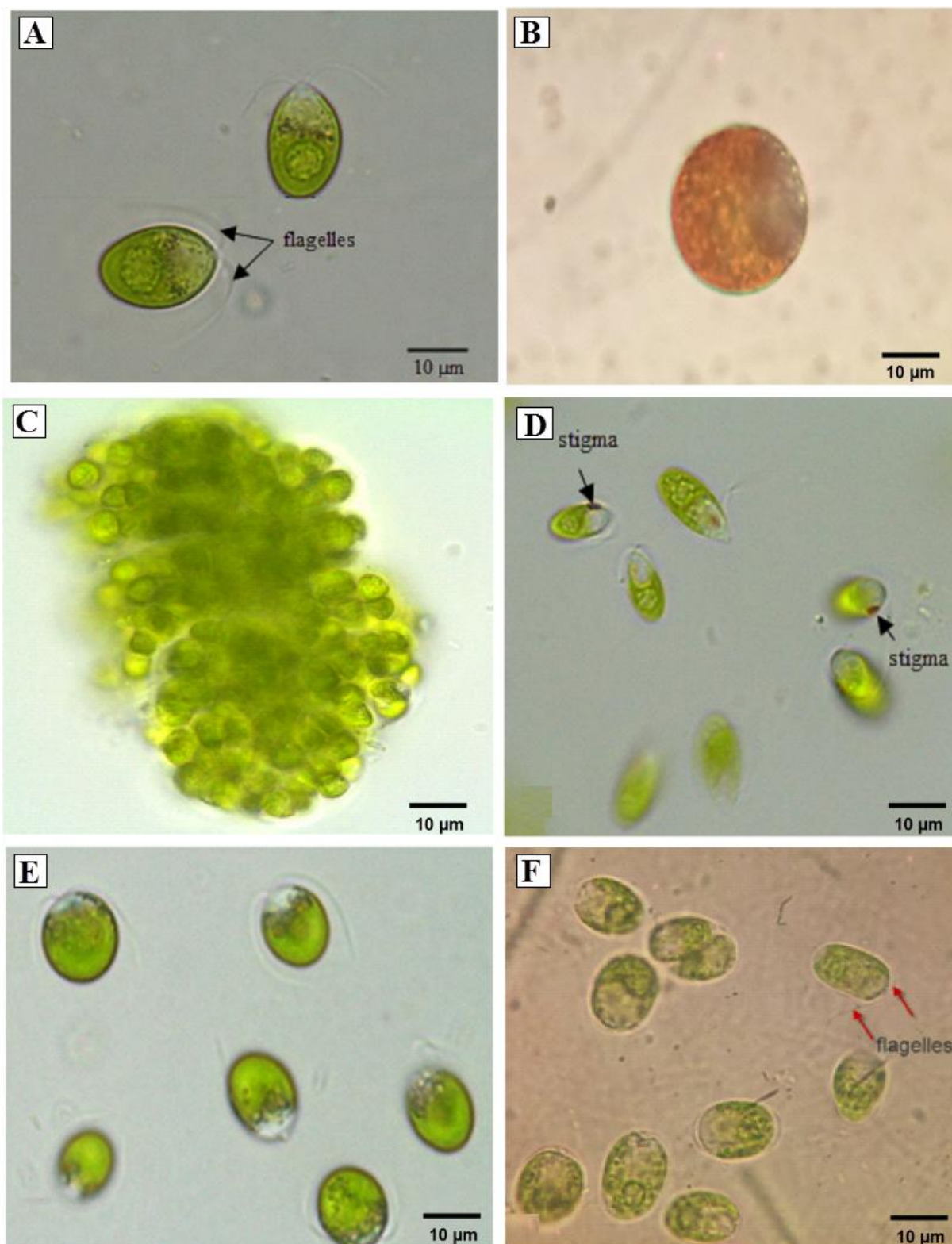


Figure 3.24: Micromorphologie des souches de micro-algues: **(A)** DunaDZ1 (phase verte), **(B)** DunaDZ1 (aplanospore de couleur orange produit durant la phase de stress), **(C)** DunaDZ2 (stade *palmella*), **(D)** DunaDZ3, **(E)** DunaDZ4 et **(F)** TC1. (G X 1000) (Photographie originale).

III.1.2. Analyses phylogénétiques

III.1.2.1. Analyses phylogénétiques des souches DunaDZ1, DunaDZ2, DunaDZ3, DunaDZ4 et TC1

Les 5 souches représentatives de chaque groupe ont fait l'objet d'une analyse phylogénétique par l'amplification des gènes 18S, ITS et *rbcL*. Les séquences obtenues ont été alignées et comparées avec les séquences des micro-algues contenues dans la base des données NCBI. La taxonomie de la micro-algue verte *Dunaliella* présente parfois certaines confusions par rapport à quelques espèces présentes au niveau des collections de culture des micro-algues, du fait des erreurs commises par certains auteurs lors de l'identification de leurs souches [6, 105]. Le problème majeur est qu'il n'existe pas de souches-types représentatives des espèces. De ce fait, il faut faire très attention au choix des séquences avec lesquelles nos souches vont être comparées.

Les souches DunaDZ1, DunaDZ2, DunaDZ3, DunaDZ4 et TC1 ont fait l'objet d'une étude phylogénétique basée sur la région ITS et les gènes *rbcL* et 18S, afin de déterminer le gène qui donne les meilleurs résultats et permet ainsi une identification assez sûre. Le meilleur gène sera considéré pour analyser le restant des souches isolées.

Après amplification, les produits de la PCR ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose, puis visualisés sous lampe UV. Les résultats montrent que les souches étudiées présentent une bande unique (figure 3.25).

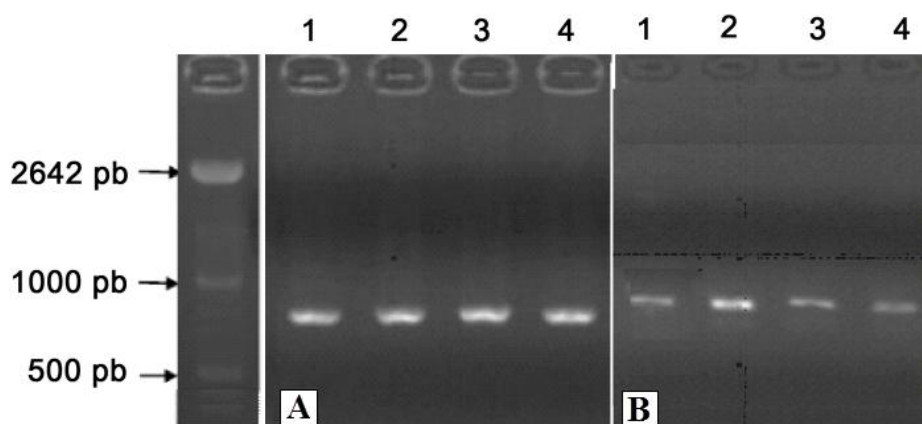


Figure 3.25: Résultat de l'électrophorèse sur gel d'agarose des ADN extraits (photographie originale): **(A)** ITS et **(B)** *rbcL*, des souches: DunaDZ1 (1); DunaDZ2 (2); DunaDZ3 (3) et DunaDZ4 (4). M: marqueur moléculaire de taille.

Pour la souche TC1, seule l'amplification du gène 18S a donné un bon résultat, donnant une séquence de 824 paires de bases (pb). L'analyse phylogénétique de cette souche a permis de la rattacher au genre *Tetraselmis* et à l'espèce *Tetraselmis chuii*, avec un pourcentage de similarité de 99,4% avec la souche *T.chuii* pgu005.

Pour les quatre autres souches (DunaDZ1, DunaDZ2, DunaDZ3 et DunaDZ4), l'amplification a réussi pour l'ITS et le rbcL, tandis que le 18S n'a pas donné une identification claire de ces souches.

L'amplification de l'ITS a permis d'obtenir des séquences de 730, 732, 761 et 817 pb pour les souches DunaDZ1, DunaDZ2, DunaDZ3 et DunaDZ4, respectivement. L'analyse phylogénétique a permis de rattacher la souche DunaDZ1 à l'espèce *D. salina*, espèce productrice de pigments caroténoïdes. Elle présente un pourcentage de similarité de 98,9% avec la souche *D. salina* CCAP 19/12, et a été classée dans le même cluster que d'autres souches de l'espèce *D. salina* qui sont présentes dans la base de données NCBI.

Le blast de la séquence de la souche DunaDZ2 a permis de la rattacher au genre *Dunaliella* et à l'espèce *Dunaliella viridis*. Elle présente un pourcentage de similarité de 96,9% avec la souche *D. viridis* NIOT-95. La souche DunaDZ3 est rattachée également à la même espèce avec un pourcentage de 98,7% avec la souche *D. viridis* MSV-1. Ces deux dernières souches sont classées dans le cluster contenant différentes souches de l'espèce *D. viridis*, connue pour son intérêt dans le domaine de la production de biofuel et comme aliment en aquaculture.

L'amplification du gène ITS pour la souche DunaDZ4 a permis de le rattacher à l'espèce *D. parva*, avec une similarité de 99,1% avec la souche *D. parva* 15.

La relation entre les isolats DunaDZ1, DunaDZ2, DunaDZ3, DunaDZ4 et les autres souches les plus proches phylogénétiquement qui se trouvent dans la base de données NCBI est illustrée dans la figure 3.26.

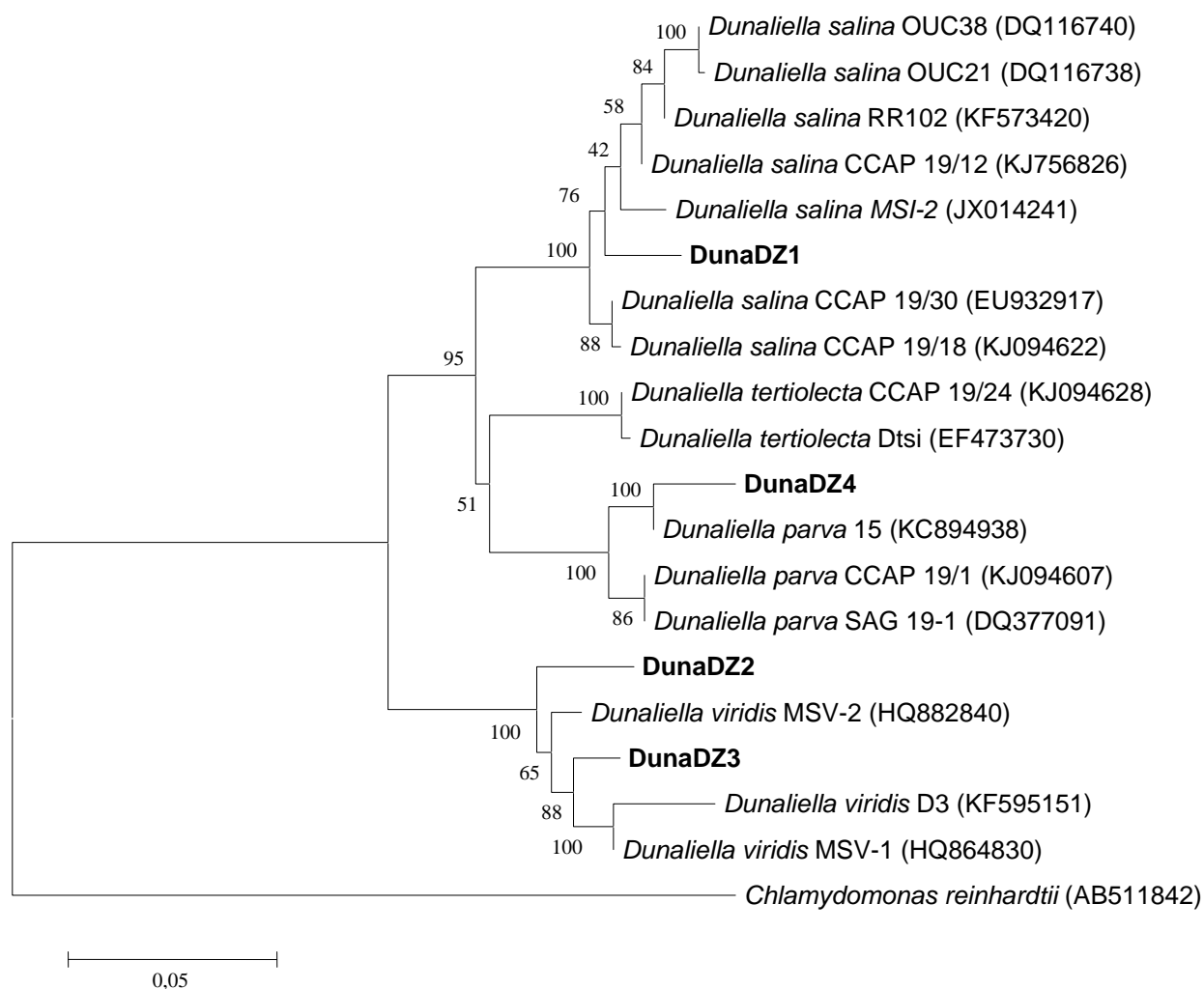


Figure 3.26: Arbre phylogénétique (neighbor-joining) basé sur l'analyse des séquences de la région codant pour ITS et montrant la relation entre les souches DunaDZ1, DunaDZ2, DunaDZ3 et DunaDZ4 avec certaines souches appartenant au genre *Dunaliella* et présentes dans la base de données NCBI.

Les nombres figurant au niveau des nœuds indiquent les taux du «bootstrap» (exprimés en pourcentages de 1000 re-échantillonnages). La barre indique 0,05 substitution par position de nucléotide. L'espèce *Chlamydomonas reinhardtii* est utilisée comme «outgroup».

L'amplification du gène *rbcl* a permis de donner des séquences d'une taille de l'ordre de 700, 866, 966 et 817 pb pour les souches DunaDZ1, DunaDZ2, DunaDZ3 et DunaDZ4, respectivement. L'analyse phylogénétique sur la base du gène *rbcl* a permis d'obtenir des résultats similaires à ceux obtenus pour l'ITS (figure 3.27).

La souche DunaDZ4, rattachée par le biais de l'ITS, à l'espèce *Dunaliella parva*, n'a pas été représentée dans l'arbre phylogénétique en raison de l'absence de séquence du gène *rbcl* de *D. parva*.

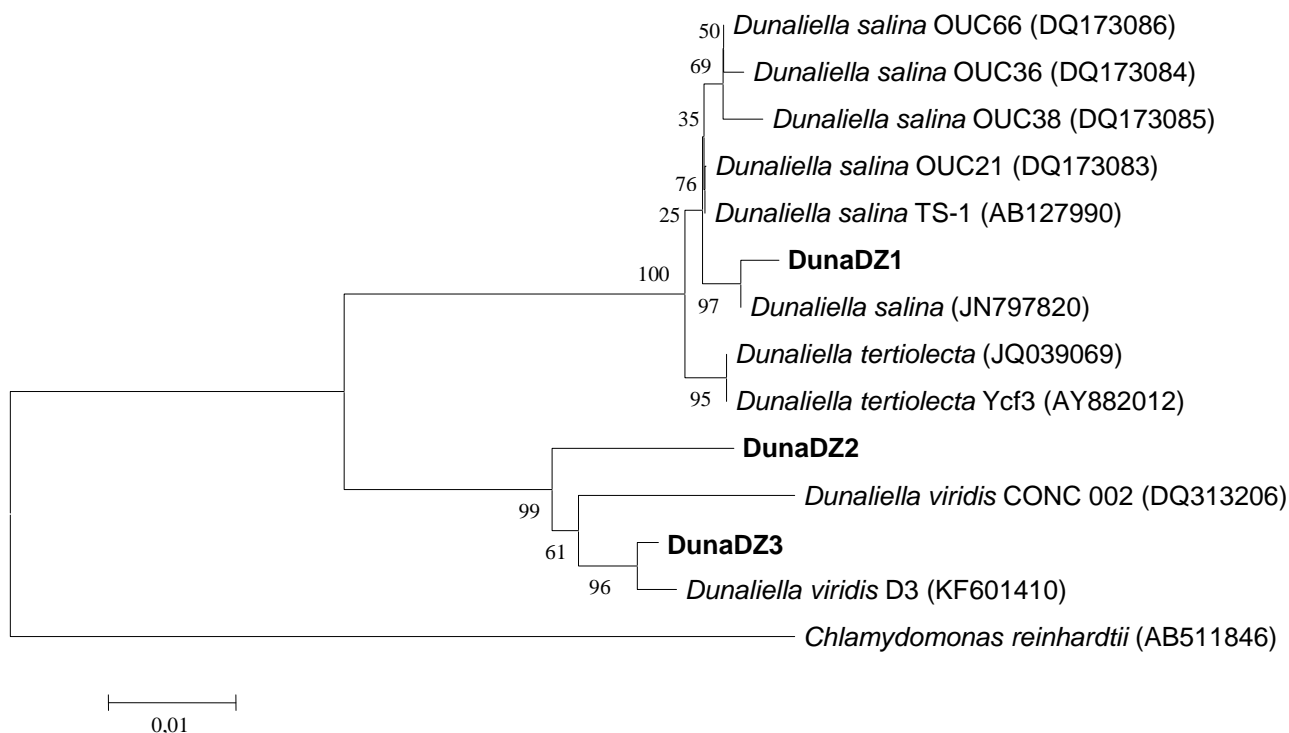


Figure 3.27: Arbre phylogénétique (neighbor-joining) basé sur l'analyse des séquences du gène codant pour le *rbcl* et montrant la relation entre les souches DunaDZ1, DunaDZ2 et DunaDZ3 avec certaines souches appartenant au genre *Dunaliella* et présentes dans la base de données NCBI.

Les nombres figurant au niveau des nœuds indiquent les taux du «bootstrap» (exprimés en pourcentages de 1000 re-échantillonnages). La barre indique 0,01 substitution par position de nucléotide. L'espèce *Chlamydomonas reinhardtii* est utilisée comme «outgroup».

III.1.2.2. Analyse phylogénétique de toutes les souches isolées

Pour le reste des isolats, c'est le gène ITS uniquement qui a été retenu pour l'analyse phylogénétique, vu que le *rbcl* a donné les mêmes résultats; de plus, l'ITS est le gène le plus utilisé pour l'identification des micro-algues appartenant aux Chlorophyceae.

L'analyse phylogénétique des isolats appartenant au genre *Dunaliella* a permis de rattacher 17 souches à l'espèce *D. salina* (similarité entre 98,9 et 100%), 6

souches à *D. viridis* (similarité entre 96,9 et 98,9%) et 1 souche à l'espèce *D. parva* (99,1% de similarité). La taille de leurs séquences, les espèces les plus proches phylogénétiquement, ainsi que les pourcentages de similarités sont données dans le tableau 3.10. L'arbre phylogénétique est donné dans la figure 3.28.

En revanche, la souche DunaDZ25 est carrément détachée de toutes les espèces de *Dunaliella* ainsi que de celles appartenant aux autres genres les plus proches (figure 3.29). *Halosarcinoclamsys*, qui est le genre le plus proche, ne possède que 86,4% de similarité avec notre souche. Il y a donc une possibilité d'avoir un nouveau genre mais qu'il faudrait cependant confirmer par le séquençage des gènes *rbcl*, 18S et d'autres. Nous précisons que cette souche ne produit pas de pigments caroténoïdes.

Tableau 3.10: Taille des séquences et pourcentages de similarité des 26 souches de micro-algues avec les espèces les plus proches qui se trouvent dans la base de données NCBI.

Isolats	Tailles des séquences (pb)	Espèces les plus proches	% de similarité
DunaDZ1	730	<i>D. salina</i> CCAP 19/12	98,9
DunaDZ2	732	<i>D. viridis</i> NIOT-95	96,9
DunaDZ3	761	<i>D. viridis</i> MSV-1	98,7
DunaDZ4	817	<i>D. parva</i> 15	99,1
DunaDZ5	661	<i>D. salina</i> MSI-2	99,5
DunaDZ6	695	<i>D. salina</i> RR102	99,7
DunaDZ7	694	<i>D. salina</i> RR102	100
DunaDZ8	653	<i>D. salina</i> MSI-1	100
DunaDZ9	658	<i>D. viridis</i> MSV-1	98,7
DunaDZ10	655	<i>D. salina</i> RR102	100
DunaDZ11	660	<i>D. salina</i> RR102	100
DunaDZ12	663	<i>D. viridis</i> D3	98,9
DunaDZ13	659	<i>D. salina</i> RR102	99,7
DunaDZ14	657	<i>D. viridis</i> MSV-2	98,1
DunaDZ15	661	<i>D. salina</i> CCAP 19/12	100
DunaDZ16	656	<i>D. salina</i> RR102	100
DunaDZ17	659	<i>D. salina</i> D2-1	100
DunaDZ18	657	<i>D. salina</i> CCAP 19/12	99,4
DunaDZ19	625	<i>D. salina</i> CCAP 19/30	100
DunaDZ20	663	<i>D. salina</i> CCAP 19/12	99,8
DunaDZ21	665	<i>D. viridis</i> MSV-2	97,1
DunaDZ22	616	<i>D. salina</i> CCAP 19/12	99,6
DunaDZ23	652	<i>D. salina</i> CCAP 19/12	99,4
DunaDZ24	654	<i>D. salina</i> CCAP 19/12	99,4
DunaDZ25	706	<i>Halosarcinochlamys cherokeensis</i> SPMO BS	86,4
TC1	824	<i>Tetraselmis chuii</i>	99,4

La région séquencée est l'ITS pour toutes les souches à l'exception de la souche TC1 (ARNr 18S).

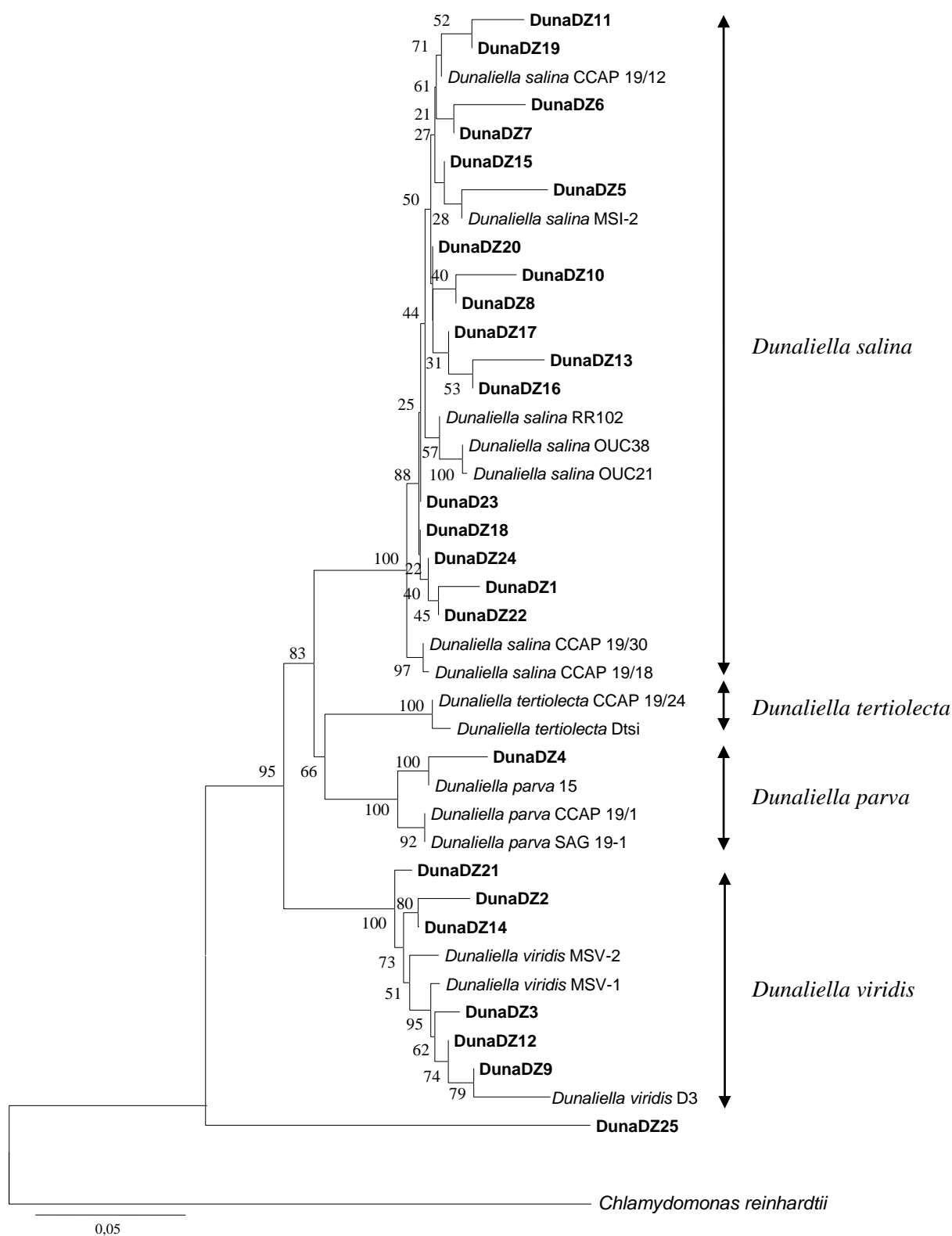


Figure 3.28: Arbre phylogénétique (neighbor-joining) basé sur l'analyse des séquences du gène codant pour ITS de l'ensemble des souches et des micro-algues appartenant au genre *Dunaliella*.

Les nombres figurant au niveau des nœuds indiquent les taux du « bootstrap » (exprimés en pourcentages de 1000 re-échantillonnages). La barre indique 0,05 substitution par position de nucléotide. L'espèce *Chlamydomonas reinhardtii* (AB511842) est donnée comme « outgroup ».

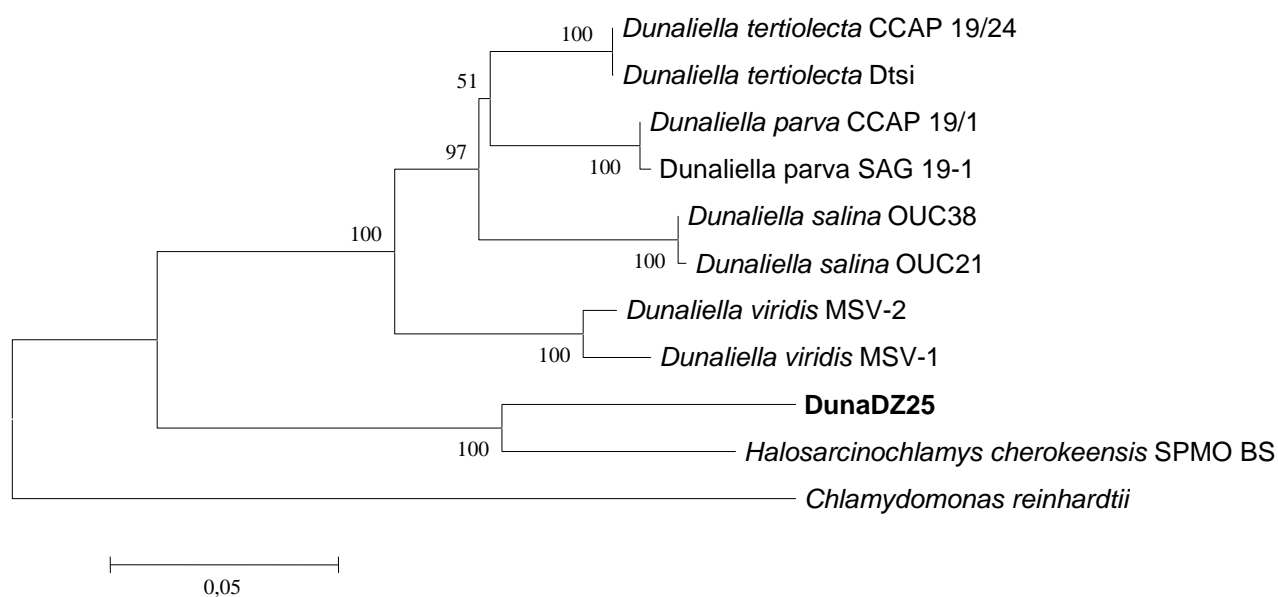


Figure 3.29: Arbre phylogénétique (neighbor-joining) basé sur l'analyse des séquences de la région codant pour l'ITS et montrant la relation entre la souche DunaDZ25 avec certaines souches appartenant au genre *Dunaliella* et au genre *Halosarcinochlamys* présentes dans la base de données NCBI.

Les nombres figurant au niveau des nœuds indiquent les taux du « bootstrap » (exprimés en pourcentages de 1000 re-échantillonnages). La barre indique 0,05 substitution par position de nucléotide. L'espèce *Chlamydomonas reinhardtii* (AB511842) est donnée comme « outgroup ».

III.1.3. Production de pigments caroténoïdes

En se basant sur l'identification micro et macromorphologique, deux souches ont été retenues pour le test de caroténogenèse, à savoir DunaDZ1 rattachée à l'espèce *Dunaliella salina* et DunaDZ4 rattachée à l'espèce *Dunaliella parva*. Il est signalé que pour toutes les souches rattachées à *D. salina* les colonies qui sont initialement vertes, deviennent oranges sur milieu solide à 2 M de NaCl, ce qui confirme la production des pigments caroténoïdes par ces dernières, et ce contrairement aux souches rattachées à *D. viridis* et à la souche DunaDZ25 qui semble appartenir à un nouveau genre.

III.1.3.1. Test de caroténogénèse

Le test de caroténogénèse par absence de nitrate a été mené pour les deux souches. Après une première phase d'accumulation de biomasse, une induction du stress par élimination de la source de nitrate du milieu de culture a été effectuée. Le virage de la couleur du vert à l'orange à été obtenu après 72 h du début du test pour la souche DunaDZ1 (figure 3.30). Cependant, la culture de la souche DunaDZ4 est restée verte (aucun virage vers l'orange), ce qui signifie que cette souche ne possède pas la capacité de production des pigments caroténoïdes.

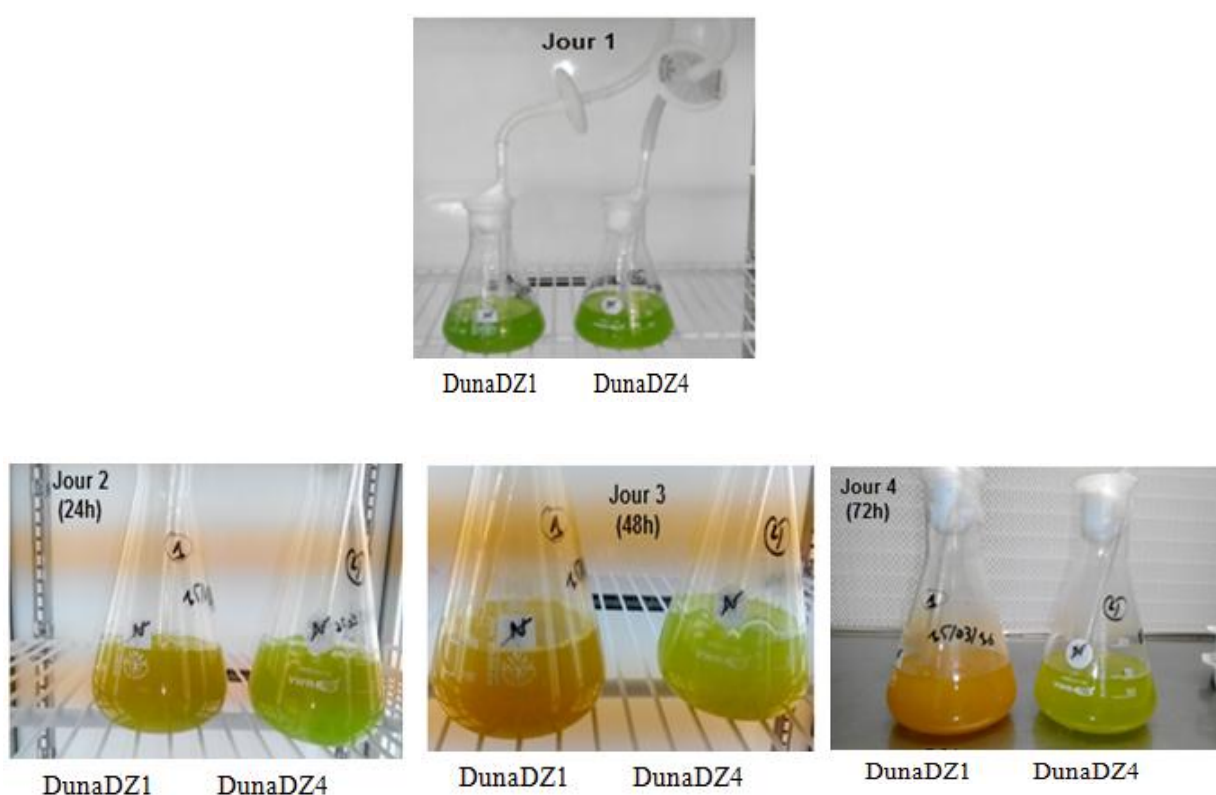


Figure 3.30: Culture des souches DunaDZ1 et DunaDZ4 durant le processus de caroténogénèse par absence de nitrate (photographie originale).

L'observation au microscope optique de la souche DunaDZ1 a montré un changement morphologique radical des cellules, de l'ovoïde de couleur verte, qui représente la forme végétative, vers le sphérique de couleur orange, qui représente les aplanospores lesquelles sont une forme de résistance chez l'espèce micro-algale *D. salina* (figure 3.31).

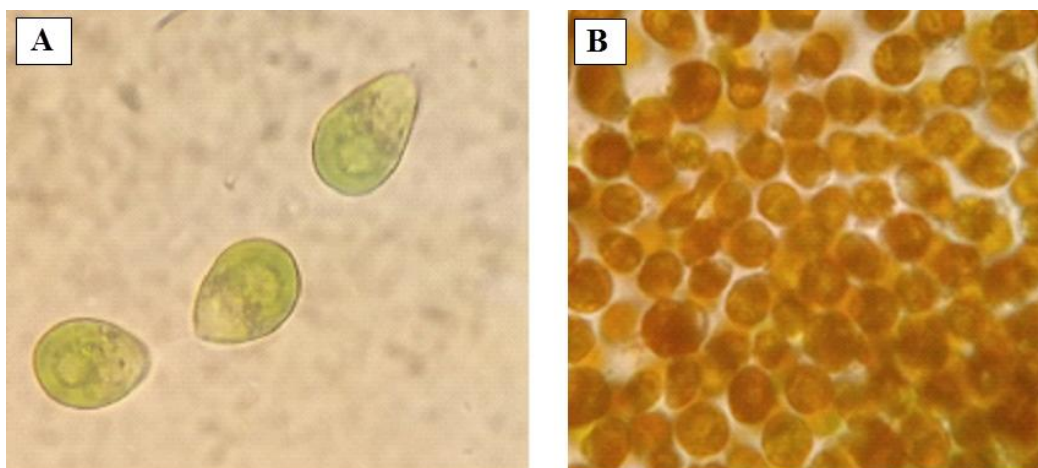


Figure 3.31: Aspect morphologique des cellules de la souche *D. salina* DunaDZ1 avant et après le stress induit par l'élimination du nitrate du milieu de culture (photographie originale) (G X 1000). **(A)** phase verte (cellules végétatives) et **(B)** phase orange (aplanospores, après le stress).

III.1.3.2. Quantification des pigments caroténoïdes de la souche DunaDZ1

Une quantification par HPLC des pigments caroténoïdes de la souche DunaDZ1 a été effectuée sur la culture en phase de stress (après 72 h de stress). La figure 3.32 illustre les taux des pigments caroténoïdes exprimés en pourcentages. Les quantités exprimées en $\mu\text{g/mL}$ sont présentées dans le tableau 3.11.

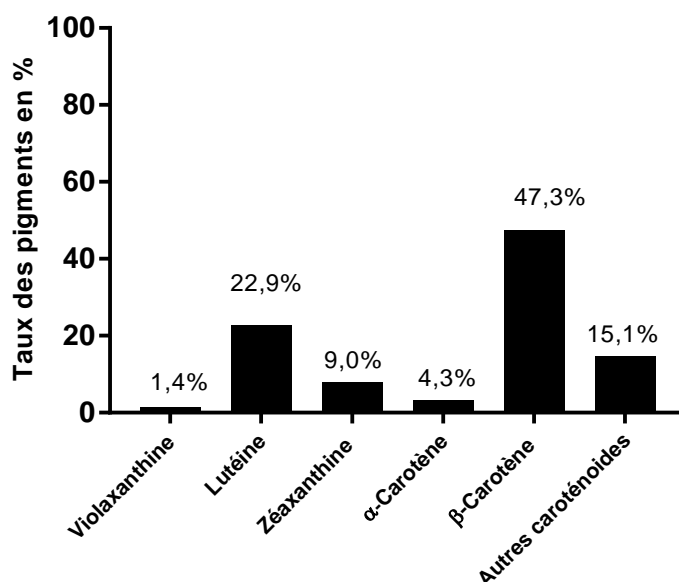


Figure 3.32: Taux des pigments caroténoïdes exprimés en pourcentage dans la culture de la souche *D. salina* DunaDZ1 soumise au stress par déficience en nitrate.

Les β -carotènes sont les pigments caroténoïdes majoritaires avec un taux de 47,35% (5,28 $\mu\text{g/mL}$), suivi par la lutéine avec un pourcentage de 22,88% (2,55 $\mu\text{g/mL}$). D'autres caroténoïdes avec des taux inférieurs ont aussi été identifiés, à savoir la zéaxanthine, l' α -carotène et la violaxanthine avec des pourcentages de 9,05, 4,32 et 1,42%, respectivement.

Tableau 3.11: Quantités des pigments caroténoïdes, exprimées en $\mu\text{g/mL}$, dans la culture de la souche *D. salina* DunaDZ1 soumise au stress par déficience en nitrate.

Pigments caroténoïdes	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)
Violaxanthine	0,16
Lutéine	2,55
Zéaxanthine	1,01
α -Carotène	0,48
β -Carotène	5,28
Autres pigments caroténoïdes	1,67
Pigments caroténoïdes totaux	11,15

III.2. Discussion

La micro-algue *Dunaliella* est présente seulement dans les eaux provenant des sebkhas de Zahrez Chergui et Zahrez Gherbi dont la couleur est orange durant l'été, signe de présence de pigments caroténoïdes. Elles sont parfois rosâtres, dues à la présence d'archaebactéries. La sebkha s'évapore partiellement durant l'été, provoquant ainsi une augmentation de la salinité qui est un facteur de stress pour certaines espèces du genre *Dunaliella*. Ce stress engendre l'accumulation des pigments caroténoïdes à l'intérieur des aplanospores de *Dunaliella*. En revanche, durant l'hiver, ces sebkhas sont vertes. Durant cette période, la pluviométrie importante provoque une dilution des eaux et par conséquent une diminution de la salinité, ce qui permet à la micro-algue *Dunaliella* de reprendre sa croissance en formant des cellules végétatives vertes.

L'eau de la sebkha de Zahrez Chergui (l'eau de Zahrez Gherbi n'ayant pas été analysée) a une conductivité électrique très élevée (135,6 mS/cm) comparativement

aux eaux des sebkhas d'Oran (65,4 mS/cm) et d'Arzew (45,6 mS/cm). Elles sont caractérisées par une salinité élevée et une richesse en magnésium et en sulfate. Des caractéristiques comparables à celles obtenues dans notre étude ont été obtenues par Boutaiba *et al.* [172] dans l'eau de la sebkha de Zahrez Chergui.

Selon une étude menée par McLachlan [200], un rapport proche de 4 de Mg^{2+}/Ca^{2+} permet une croissance optimale de *Dunaliella*. Dans notre cas ce rapport est de 0,31, 0,32 et 3,23 pour les sebkhas d'Arzew, d'Oran et de Zahrez Chergui, respectivement. Le rapport Mg^{2+}/Ca^{2+} obtenu pour Zahrez Chergui est le seul qui soit proche de la valeur recommandée.

L'identification morphologique des espèces appartenant au genre *Dunaliella* n'est pas toujours facile car les micro-algues appartenant à ce genre changent de forme en fonction des variations des facteurs environnementaux [201, 202].

Pour les études phylogénétiques des souches de *Dunaliella*, la difficulté principale concerne les informations erronées (souches et séquences) déposées par certains auteurs dans les collections de cultures et dans les bases de données. Cette difficulté est aggravée par l'absence de souche-type pour chacune des espèces. L'identification demeure possible après consultation de plusieurs articles dans lesquels les auteurs signalent les fausses identifications et proposent une re-identification des souches sur la base de nouvelles séquences qu'ils ont effectuées [6, 107]. Afin d'éviter ce problème, Assunção *et al.* [107] ont jugé nécessaire d'établir des souches-types pour les micro-algues du genre *Dunaliella*.

L'identification des espèces de *Dunaliella* nécessite une compréhension approfondie des caractéristiques moléculaires qui doit être complétée par une étude morphologique et parfois biochimique telles que la production ou non des pigments caroténoïdes [203]. Preetha *et al.* [106] ont effectué une analyse phylogénétique de 9 souches de *Dunaliella* isolées à partir des lacs salins indiens, en amplifiant l'ITS et le *rbcL*. Ils ont souligné la nécessité de combiner les informations obtenues en considérant les critères morphologiques, physiologiques et moléculaires, afin d'aboutir à une identification fiable des souches.

Dans notre cas, l'analyse phylogénétique des 26 souches isolées a permis l'identification de 17 d'entre elles à l'espèce *D. salina* et une à l'espèce *D. parva* connues dans la littérature comme étant productrices de pigments caroténoïdes. Quatre souches ont été rattachées à l'espèce *Dunaliella viridis* (non productrice de pigments caroténoïdes) et une souche (DunaDZ25) semble appartenir à un nouveau genre, son originalité devant être confirmée ultérieurement par une étude polyphasique approfondie. Une souche de *D. salina* (DunaDZ1) et une de *D. parva* (DunaDZ4) ont été choisies pour le test de caroténogenèse. Seule *D. salina* DunaDZ1 s'est révélée productrices de pigments caroténoïdes. La souche DunaDZ4, rattachée à *D. parva*, ne produit pas ces pigments. Dans la littérature, *D. parva* est connue pour produire une faible quantité de pigments caroténoïdes [11, 204], mais il se pourrait qu'il existe des souches non productrices ou productrices de très faibles quantités dans des conditions spéciales.

La continuité de nos travaux a été effectuée sur la souche DunaDZ1. Cette souche a présenté un profil chromatographique des pigments caroténoïdes caractéristique à celui de l'espèce *D. salina*, le β -carotène étant le pigment majoritaire, ce qui confirme l'identification de la souche DunaDZ1 à *D. salina*. Dans une étude menée sur des souches de *Dunaliella* isolées à partir du lac salé «Grassmere/Kapara Te Hau» (Nouvelle Zélande), 17 souches ont été collectées et identifiées à l'espèce *D. salina* après une étude basée sur les critères morphologiques, physiologiques et moléculaires. Pour l'ensemble de ces souches, le pigment caroténoïde majoritaire est le β -carotène (avec la présence de deux isomères, *cis* et *trans*) suivi par d'autres pigments caroténoïdes tels que la lutéine, la zéaxanthine et l' α -carotène [4], ce qui correspond aux résultats que nous avons obtenus.

III.3. Conclusion

Les travaux réalisés dans cette partie ont permis d'aboutir à l'isolement de plusieurs souches de *Dunaliella*, notamment l'espèce *D. salina*, connue pour son intérêt dans le domaine de la production des pigments caroténoïdes et des antioxydants naturels. Une étude taxonomique basée sur des critères morphologiques, moléculaires et biochimiques a permis d'aboutir à une identification

de toutes les souches isolées: 17 souches rattachées à l'espèce *D. salina*, une à *D. parva*, six à *D. viridis* et une à un possible nouveau genre. Toutes les souches rattachées à *D. salina* produisent des pigments caroténoïdes. Une des souches, DunaDZ1, a fait l'objet d'une étude plus détaillée sur la production de pigments caroténoïdes, le β -carotène étant le pigment majoritaire.

Dans les parties suivantes de nos travaux, le processus de caroténogenèse de cette souche a été développé, afin d'aboutir, à l'échelle laboratoire à une production maximale en pigments caroténoïdes, spécialement le β -carotène.

IV. CROISSANCE DE LA SOUCHE DUNADZ1 A DIFFERENTES CONCENTRATION DE NaCl ET PRODUCTION DE PIGMENTS

IV.1. Résultats

Cette étude a été menée afin de connaître l'optimum de salinité (NaCl) de la souche DunaDZ1. Cet optimum est déterminé par un comptage cellulaire et aussi par un dosage des pigments chlorophylliens. Un dosage des pigments caroténoïdes est également effectué.

IV.1.1. Cinétique de croissance par comptage cellulaire

Une cinétique de croissance cellulaire de la souche DunaDZ1 à cinq concentrations de NaCl (1; 1,5; 2; 3 et 4 M) a été réalisée sur le milieu liquide Semenenko-Abdullaev. La figure 3.33 montre le suivi durant 9 jours de la croissance par comptage cellulaire à différentes salinités.

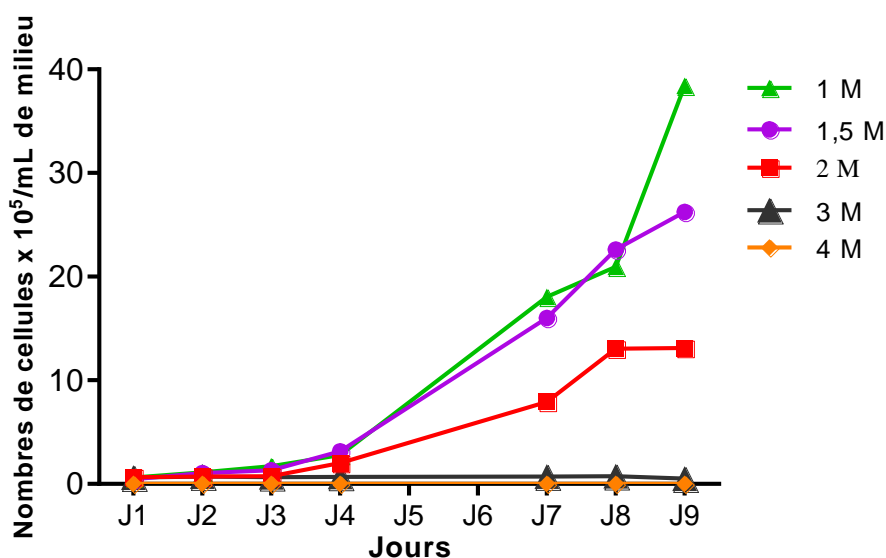


Figure 3.33: Cinétique de croissance de la souche DunaDZ1 à différentes concentrations de NaCl, dans le milieu de Semenenko-Abdullaev.

A 1, 1,5 et 2 M de NaCl, la courbe de croissance de la souche DunaDZ1 commence par une phase de latence assez longue et qui dure trois jours. Durant cette période le nombre de cellules est constant. Par la suite, après une courte phase d'accélération entre le 3^{ème} et le 4^{ème} jour. La phase exponentielle débute au-delà du 4^{ème} jour. Un optimum de croissance est atteint au bout du 9^{ème} jour d'incubation dans le milieu à 1 M de NaCl, ce qui correspond au nombre cellulaire le plus élevé ($38,4 \times 10^5$ cellules/mL). Un nombre de cellules nettement inférieur a été obtenu pour une salinité de NaCl de 1,5 et 2 M ($26,25 \times 10^5$ et $13,12 \times 10^5$ cellules/mL, respectivement). Cependant, pour une salinité de 3 M, il n'y a presque pas de croissance. A la fin de l'incubation le nombre de cellules est de $0,5 \times 10^5$ par millilitre. En revanche, nous constatons une mort cellulaire par choc osmotique pour la culture à 4 M de NaCl. La culture vire du vert au transparent au bout de 24 h d'incubation.

La figure 3.34 montre la micromorphologie des cellules de la souche DunaDZ1 à la fin de l'incubation et à différentes concentrations de NaCl. Les photographies ont été prises à la fin de la phase exponentielle, après un appauvrissement du milieu de culture. Les variations de la concentration en NaCl provoquent un changement de la morphologie et de la couleur des cellules. Ces dernières changent du vert au vert

jaunâtre pour les concentrations de 1, 1,5 et 2 M et vers le jaune orangé pour une concentration de NaCl de 3 M.

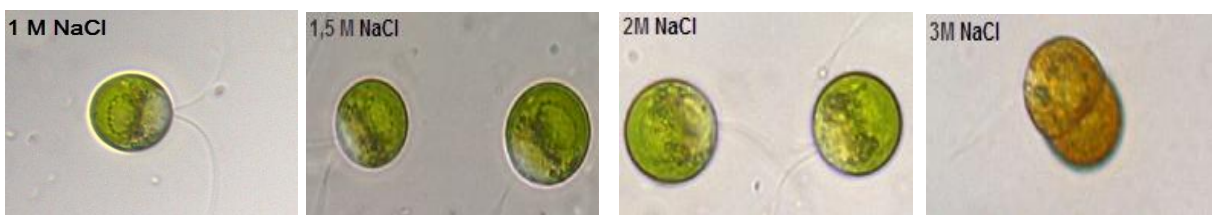


Figure 3.34: Micromorphologie des cellules de la souche *D. salina* DunaDZ1 (G x 1000) à différentes concentrations de NaCl (photographie originale).

IV.1.2. Quantification des pigments caroténoïdes et des pigments photosynthétiques

L'évolution des pigments caroténoïdes et photosynthétiques (chlorophylles a et b) de la souche DunaDZ1 en fonction de la concentration en NaCl et du temps a été également suivie pendant neuf jours. Les résultats sont illustrés par la figure 3.35.

La chlorophylle a atteint un maximum de 19,62 $\mu\text{g/mL}$ au bout du 9^{ème} jour d'incubation, pour la culture contenant une concentration de NaCl à 1 M, suivie par les cultures à 1,5 et 2 M avec des valeurs de 15,75 et 10,58 $\mu\text{g/mL}$, respectivement. Au même temps d'incubation, la quantité de chlorophylle a n'est que de 0,66 $\mu\text{g/mL}$ à 3 M de NaCl et nulle à 4 M de NaCl. Ces résultats sont en adéquation avec ceux obtenus pour la courbe de croissance (par comptage cellulaire) à différentes concentrations en NaCl.

En revanche, la teneur maximale en chlorophylle b (12,50 $\mu\text{g/mL}$) est enregistrée pour la culture à 1,5 M de NaCl, suivie par la culture à 1 et 2 M avec des valeurs de 9,75 et 7,14 $\mu\text{g/mL}$, respectivement. Une quantité moindre est obtenue à 3 M de NaCl et nulle à 4 M.

Au 9^{ème} jour d'incubation, la teneur la plus élevée en pigments caroténoïdes totaux qui est de 2,22 $\mu\text{g/mL}$ est enregistrée pour la culture contenant 1 M de NaCl, suivie par les cultures à 1,5 et 2 M avec des teneurs très proches (1,30 et 1,21 $\mu\text{g/mL}$, respectivement). A 3 M de NaCl, la teneur en pigments caroténoïdes est de 1,26 $\mu\text{g/mL}$ le 8^{ème} jour et chute à 0,19 $\mu\text{g/mL}$ le 9^{ème} jour. A 4 M de NaCl, nous

notons l'absence de pigments caroténoïdes (en raison de l'absence de croissance de la souche DunaDZ1).

Cependant lorsque les résultats sont exprimés en picogramme par cellule, la quantité la plus élevée de pigments caroténoïdes est obtenue à 2 M NaCl (0,92 pg/cellule).

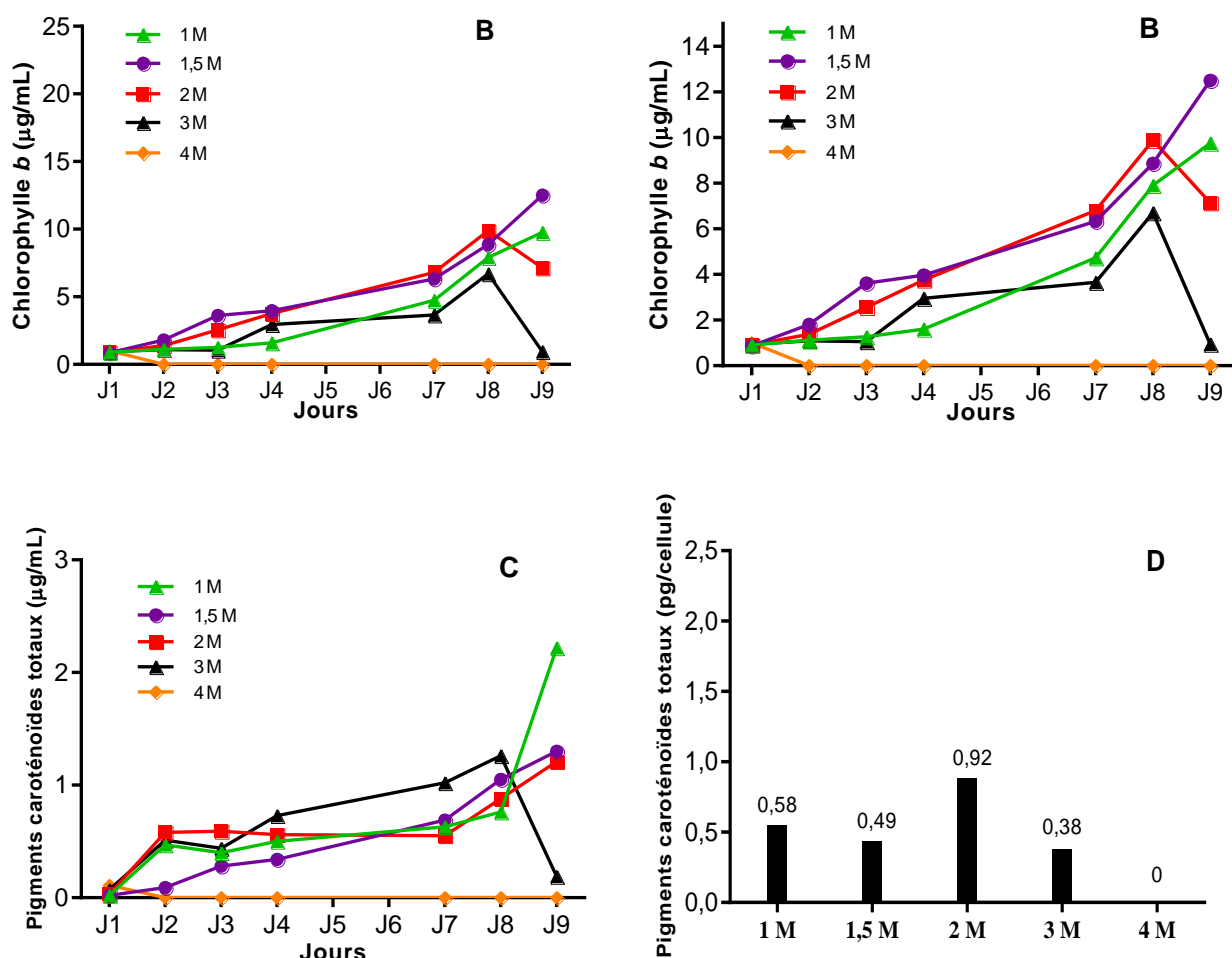


Figure 3.35: Evolution des pigments photosynthétiques et caroténoïdes en fonction de la salinité et du temps. **(A)** chlorophylle a, **(B)** chlorophylle b, **(C)** teneurs en pigments caroténoïdes totaux, exprimés en microgrammes par millilitre et **(D)** teneurs en pigments caroténoïdes totaux au neuvième jour d'incubation, exprimées en picogrammes par cellule.

IV.2. Discussion

Les résultats montrent que la croissance de la souche de *D. salina* DunaDz1 est étroitement liée à la salinité. Plus la salinité augmente plus la croissance diminue,

l'optimum étant de 1 M de NaCl. C'est la concentration en NaCl qui permet une meilleure division cellulaire et par conséquent une bonne accumulation de biomasse. Chen et Jiang [67] ont trouvé un optimum de croissance à une salinité de 2 M pour la souche *D. salina* UTEX 200. Abu-Rezq *et al.* [205] ont testé quatre différentes concentrations en NaCl (0,4; 0,5; 0,6 et 0,7 M) et ont constaté que la croissance de *D. salina* Kuwaiti est meilleure à 0,7 M de NaCl. Ahmed *et al.* [206] ont également testé différentes concentrations en NaCl qui oscillent de 0,5 à 2,5 M pour la souche de *D. salina* SA 134. Ils ont trouvé le nombre de cellules le plus élevée pour une concentration en NaCl de 2 M. L'optimum de salinité varie donc d'une souche à une autre; il oscille généralement entre 1 et 2 M.

Dans son environnement naturel, *D. salina* peut survivre dans des milieux contenant diverses concentrations en NaCl, pouvant aller de 0,5 M jusqu'à la saturation qui est de 5 M [207]. Le glycérol, qui est un osmolyte, joue un rôle très important chez *D. salina* lorsqu'elle est soumise à des concentrations variables de NaCl. La synthèse ou l'élimination du glycérol par *Dunaliella* dans le milieu intracellulaire permet d'équilibrer, par osmose, la salinité externe, ce qui permet aux cellules de reprendre leur croissance [8]. En plus du rôle important du glycérol, il existe d'autres voies qui permettent à *D. salina* de survivre dans un environnement hyper salin, comme le contrôle du flux ionique dans le cytoplasme, l'induction de l'expression des gènes et l'accumulation de certaines protéines [121].

La salinité est considérée comme un facteur de stress pour *D. salina*, déclenchant ainsi la caroténogénèse. Cependant, plus la salinité augmente plus la croissance est ralentie, et par conséquent plus la teneur en pigments caroténoïdes diminue. Pour éviter ce problème il est nécessaire d'employer la technique appelée « culture en deux phases »: une première phase d'accumulation de biomasse à une salinité optimale de croissance (à 1 M), et une deuxième phase, dite « phase de stress », appliquée à la fin de la phase exponentielle pour induire la caroténogénèse. C'est par l'usage de cette technique que le taux des pigments caroténoïdes récolté est le plus important. Nous avons donc utilisé cette technique dans les travaux ultérieurs.

V. PRODUCTION DE PIGMENTS CAROTENOIDES EN PHASE DE STRESS

Dans cette partie, la culture en deux phases a été employée et deux milieux de culture ont été testés (Johnson et f/2). Cette technique consiste en une première phase de croissance de la souche DunaDZ1 qui correspond à la phase d'accumulation de la biomasse et qui a duré 12 jours. Par la suite, une deuxième phase, appelée phase de stress, a été appliquée pour l'induction de la caroténogénèse.

V.1. Résultats

V.1.1. Phase de croissance: accumulation de la biomasse

Les résultats du suivi de la croissance par le biais du comptage cellulaire et l'évolution de la teneur en chlorophylles *a* et *b* sont illustrés par la figure 3.36.

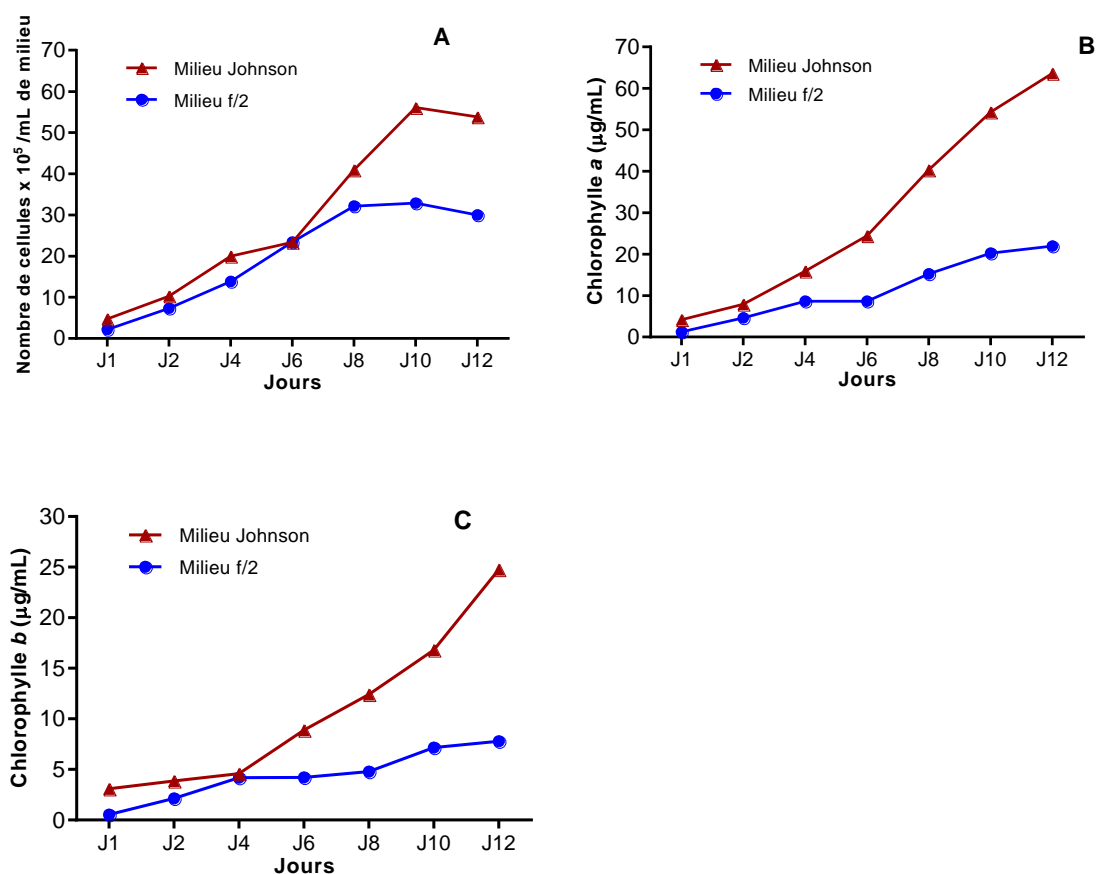


Figure 3.36: Phase de croissance et production de chlorophylles *a* et *b* par la souche DunaDZ1. **(A)** nombre de cellules par millilitre de milieu, **(B)** chlorophylle *a* et **(C)** chlorophylle *b*. Les résultats sont exprimés en microgramme par millilitre de milieu.

Le nombre de cellules augmente progressivement dans les deux milieux de culture. Le maximum de croissance est enregistré au 10^{ème} jour d'incubation. Les valeurs enregistrées sont de $56,09 (\pm 0,8) \times 10^5$ et $32,86 (\pm 0,9) \times 10^5$ cellules/mL dans les milieux Johnson et f/2, respectivement. Les courbes de suivi de la croissance par le dosage des chlorophylles *a* et *b* suivent celles du nombre de cellules. Une augmentation progressive des pigments chlorophylliens a été enregistrée pour atteindre des teneurs de chlorophylle *a* de $63,63 \pm 0,01$ et $21,97 \pm 0,03$ µg/mL pour les milieux Johnson et f/2, respectivement. La courbe de la chlorophylle *b* montre également une augmentation des teneurs pour atteindre au 10^{ème} jour des valeurs de $24,76 \pm 0,13$ et $7,35 \pm 0,8$ µg/mL, sur milieux Johnson et f/2, respectivement.

Cependant, le processus de caroténogenèse a été accéléré dans le milieu f/2 qui s'est révélé être meilleur que le milieu Johnson. La teneur en pigments caroténoïdes est de $13,44 \pm 0,1$ µg/mL dès le 6^{ème} jour, de $28,58 \pm 0,08$ µg/mL le 8^{ème} jour, et atteint un maximum de $42,78 \pm 0,4$ µg/mL le 10^{ème} jour (figure 3.37). Dans le milieu Johnson la teneur maximale en pigments caroténoïdes totaux est de $22,43 \pm 0,07$ µg/mL obtenue le 12^{ème} jour.

Le ratio entre les pigments caroténoïdes totaux et la chlorophylle *a* est constant dans le milieu Johnson (~ 0,3), tandis que dans le milieu f/2 il augmente rapidement de 0,46 au début de l'incubation pour atteindre 2,11 à la fin de la phase exponentielle. Ceci est dû au taux élevé des pigments caroténoïdes totaux dans le milieu f/2 suite à un appauvrissement du milieu en nutriments.

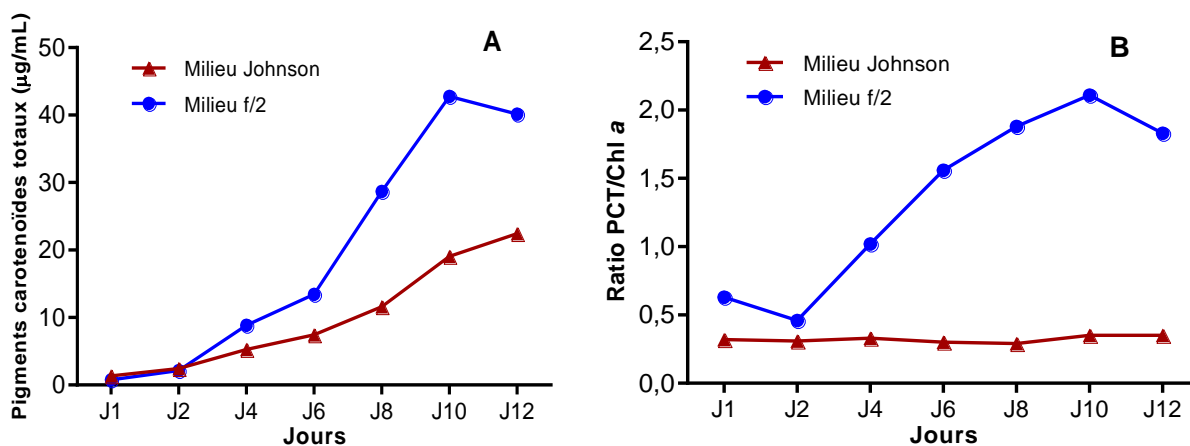


Figure 3.37: Production de pigments caroténoïdes par la souche *D. salina* DunaDZ1 durant la phase de croissance (sans stress). **(A)** pigments caroténoïdes totaux et **(B)** ratio pigments caroténoïdes totaux/chlorophylle a.

PCT: pigments caroténoïdes totaux; **Chl a:** chlorophylle a.

V.1.2. Phase de stress: production de pigments caroténoïdes

Les résultats du suivi de la production des pigments caroténoïdes totaux de la souche de DunaDZ1 durant la phase de stress (stress salin, stress sans nitrate et stress dû au cumul des deux facteurs) sont illustrés par la figure 3.38. Les valeurs sont exprimées en picogramme par cellule, comme cela est recommandé dans la littérature. Pour mieux comprendre l'évolution des pigments caroténoïdes, les teneurs durant la phase de stress sont présentées dans la même figure que celles de la phase de croissance.

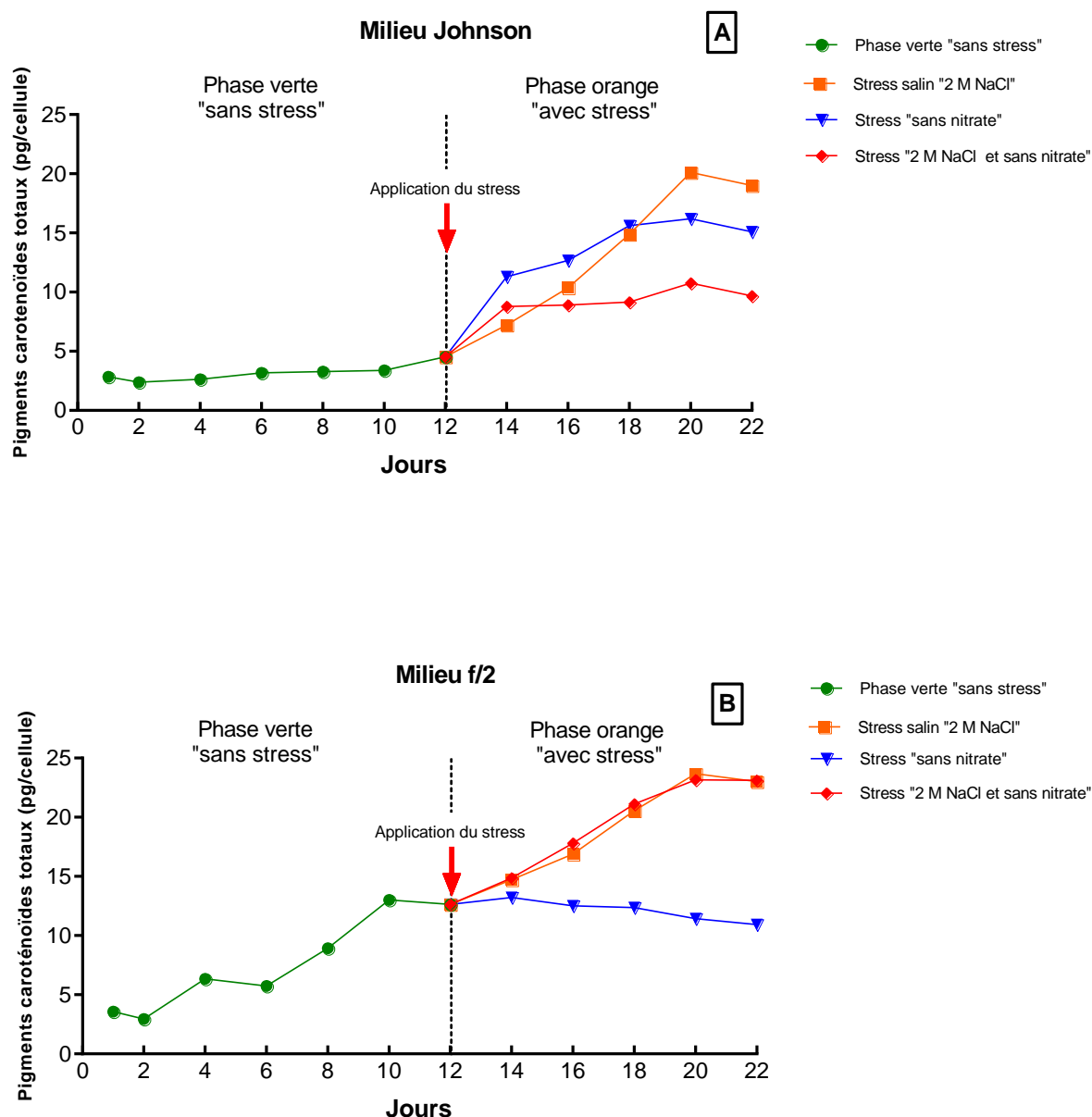


Figure 3.38: Evolution des pigments caroténoïdes totaux de la souche *D. salina* DunaDZ1 durant la phase de croissance (phase verte) et durant la phase de stress (phase orange). **(A)** dans le milieu Johnson et **(B)** dans le milieu f/2. Les résultats sont exprimés en picogrammes (pg) par cellule.

La phase de croissance (phase verte) a duré douze jours. Le maximum de pigments caroténoïdes a été enregistré dans le milieu f/2 ($13,02 \pm 0,35$ pg/cellule), tandis que pour le milieu Johnson le taux était de $4,54 \pm 0,15$ pg/cellule. A la fin de la phase exponentielle qui correspond au 12^{ème} jour d'incubation, différentes conditions de stress (stress salin, sans nitrate et cumul des 2 facteurs) ont été appliquées pour les deux milieux. La réponse de la souche DunaDZ1 à ces différentes conditions de

stress et dans les deux milieux est illustrée dans la figure 3.38. Si l'induction de la caroténogénèse avait eu lieu dès le début de la culture (culture en une seule phase), il y'aurait un retard de la croissance et par conséquent un faible taux de pigments caroténoïdes. Selon la littérature, l'emploi de la stratégie de la culture en deux phases conduit à des teneurs en pigments caroténoïdes plus élevées.

V.1.2.1. Caroténogénèse par absence de nitrate

Le taux des pigments caroténoïdes totaux durant la phase de stress de la souche DunaDZ1 par déficience en nitrate a été nettement amélioré dans le milieu Johnson. Après huit jours d'incubation, la teneur des pigments caroténoïdes totaux est de $16,2 \pm 0,24$ pg/cellule, ce qui correspond à une valeur trois fois plus élevée que le taux avant stress. Cependant, pour le milieu f/2, l'amélioration du taux de pigments caroténoïdes était minime; le taux est passé de $12,64 \pm 0,14$ pg/cellule au début de la phase de stress, à $13,21 \pm 0,05$ pg/cellule durant le deuxième jour de stress, pour diminuer jusqu'à $10,92 \pm 0,14$ pg/cellule à la fin du test. Le test de caroténogénèse par absence de nitrate est donc plus efficace sur milieu Johnson que sur milieu f/2.

V.1.2.2. Caroténogénèse par stress salin

Des cultures de la souche DunaDZ1 ont été menées dans le milieu Johnson et f/2 contenant 2 M de NaCl. Une amélioration très nette des taux de pigments caroténoïdes totaux dans les deux milieux de culture a été constatée. Les valeurs sont de l'ordre de $20,12 \pm 0,44$ et $23,69 \pm 0,12$ pg/cellule au 8^{ème} jour d'incubation dans les milieux Johnson et f/2, respectivement. Ces valeurs étaient nettement inférieures juste avant l'application du stress: $4,54 \pm 0,3$ et $12,64 \pm 0,54$ pg/cellule, pour les milieux Johnson et f/2, respectivement. L'effet de la salinité sur l'amélioration des teneurs en pigments caroténoïdes chez la souche DunaDZ1 est donc confirmé.

V.1.2.3. Caroténogénèse par absence de nitrate combinée au stress salin

Le stress par le cumul des deux facteurs de stress précédent (déficience en nitrate et une salinité de 2 M NaCl) a aussi conduit chez la souche DunaDZ1 à une augmentation des teneurs en pigments caroténoïdes totaux pour les deux milieux de culture testés. Dans le milieu Johnson, les valeurs sont de $10,76 \pm 0,25$ pg/cellule

(deux fois supérieure), après huit jours d'incubation dans ces conditions. Ces valeurs sont inférieures à celles enregistrées par chaque facteur de stress séparément. En revanche, dans le milieu f/2, la combinaison des deux facteurs de stress a conduit à des taux comparables à ceux obtenus par le stress salin, le taux étant de $23,68 \pm 0,12$ pg/cellule.

V.2. Discussion

Chez la souche DunaDZ1, le taux des pigments caroténoïdes augmente suite à tous les facteurs de stress appliqués, à savoir, le stress salin, l'absence de nitrate et la combinaison de ces deux facteurs. Le stress salin (NaCl à 2 M) est le stress qui a abouti à des teneurs en pigments caroténoïdes les plus élevées et cela pour les deux milieux de culture, f/2 et Johnson.

Plusieurs auteurs ont testé différents facteurs afin d'obtenir un maximum de pigments caroténoïdes. Hexin *et al.* [208] ont démontré que le stress par déficience en nutriments est un facteur de stress relativement faible en comparaison avec le stress salin. Ces résultats ont été confirmés par notre étude. Certains auteurs affirment que l'ajustement de la lumière et de la salinité sont l'une des meilleures stratégies pour atteindre un optimum de production de pigments caroténoïdes à partir de la biomasse de *D. salina* [209]. Cependant, d'autres auteurs ont constaté que la salinité n'a pas un effet clair sur l'accumulation des β -carotènes chez *D. salina* [210].

Dans le milieu de culture f/2, la combinaison de deux facteurs de stress (salinité et déficience en nitrate) a conduit à des résultats très proches à ceux obtenus par le stress salin. Par ailleurs, pour le milieu Johnson les résultats obtenus par le cumul de deux facteurs étaient faibles en les comparant avec ceux obtenus pour chaque facteur pris séparément. Ces résultats peuvent être expliqués par le choc osmotique résultant de l'accumulation de ces deux facteurs de stress, conduisant ainsi à la mortalité des cellules, et par conséquent à l'obtention en teneurs de pigments caroténoïdes moindres.

La teneur en pigments caroténoïdes totaux la plus élevée ($23,69 \pm 0,12$ pg/cellule) a été obtenue dans le milieu f/2, en appliquant le stress salin (2 M NaCl).

La quantité obtenue dans cette étude est plus élevée que celles obtenues par Nikookar *et al.* [211] et Fazeli *et al.* [212], qui sont de l'ordre de 6,9 et 5,50 pg/cellule, respectivement. Le facteur de stress appliqué lors de ces deux études est, tout comme dans notre cas, le stress salin à 2 M NaCl. Par ailleurs, pour le même facteur de stress appliqué pour différentes souches de *D. salina*, Cifuentes *et al.* [213] ont trouvé des teneurs en pigments caroténoïdes variant de 4,1 à 27,6 pg/cellule.

Ces résultats indiquent clairement que la quantité de pigments caroténoïdes produite par *D. salina* est étroitement liée au milieu utilisé, aux facteurs de stress appliqués et aux souches de *D. salina* étudiées. Il est ainsi très difficile de comparer les résultats obtenus avec ceux des autres auteurs du fait que différents facteurs de stress et différentes souches de *D. salina* ont été testés. La stratégie de culture des souches doit aussi être prise en considération, comme par exemple, savoir si le stress a été appliqué dès le début de la culture ou bien à la fin de la phase exponentielle. Tous ces facteurs doivent être pris en compte lors de la comparaison des résultats.

La réponse intrinsèque de chaque souche à chaque facteur de stress et aux interactions de différentes conditions environnementales démontre qu'il est difficile de prédire les conditions qui conduisent à une quantité maximale de pigments caroténoïdes [119]. Par conséquent, comme nous l'avons signalé auparavant, la caroténogenèse varie non seulement en fonction de la composition du milieu de culture et des facteurs environnementaux, mais aussi en fonction de la souche.

Dans notre cas, le test de caroténogenèse montre que le milieu f/2 peut être sélectionné comme le meilleur milieu de culture pour la souche DunaDZ1. Il présente l'avantage d'être un milieu de culture simple et moins onéreux que le milieu Johnson. La stratégie en deux phases a été retenue pour le reste de nos études. La salinité (2 M NaCl) est choisie comme étant le meilleur facteur de stress pour la production des pigments caroténoïdes.

VI. INFLUENCE DES METHODES DE RECOLTE DE LA BIOMASSE SUR LA QUALITE NUTRITIONNELLE DE *D. salina*

En plus de la production des pigments caroténoïdes, nous avons déterminé la qualité nutritionnelle de la souche *D. salina* DunaDZ1. Comme cette qualité est dépendante des méthodes de récolte de la biomasse, nous avons étudié l'influence de ces méthodes sur la qualité nutritionnelle.

Dans cette partie nous avons étudié deux méthodes de récolte de biomasse, la centrifugation à différentes rotations et la floculation par variation du pH. Une fois la biomasse récupérée, elle est lyophilisée, puis caractérisée par le dosage des protéines et des carbohydrates ainsi que par la détermination du profil des acides gras.

VI.1. Résultats

VI.1.1. Récolte de la biomasse de *D. salina* DunaDZ1 par centrifugation

La récolte par centrifugation a été testée sur la phase verte de la souche DunaDz1. Différentes rotations de centrifugation et différentes durées ont été utilisées. La séparation de la biomasse du milieu de culture est évaluée par le calcul de l'efficacité de la récupération qui est exprimée en pourcentage. Les résultats sont illustrés dans la figure 3.39.

L'efficacité de la récupération augmente avec l'augmentation du nombre de rotation et du temps. Un maximum de récupération de $94,85 \pm 0,47\%$ a été enregistré pour un nombre de tours de 2500 rpm pendant 10 min. La plus faible récupération est de $74,37 \pm 0,74\%$, obtenue par la rotation la plus faible (500 rpm) et la durée la plus courte, de 3 min. Après avoir testé des rotations supérieures à 2500 rpm, nous avons constaté que l'intégrité des cellules est touchée (éclatement des cellules).

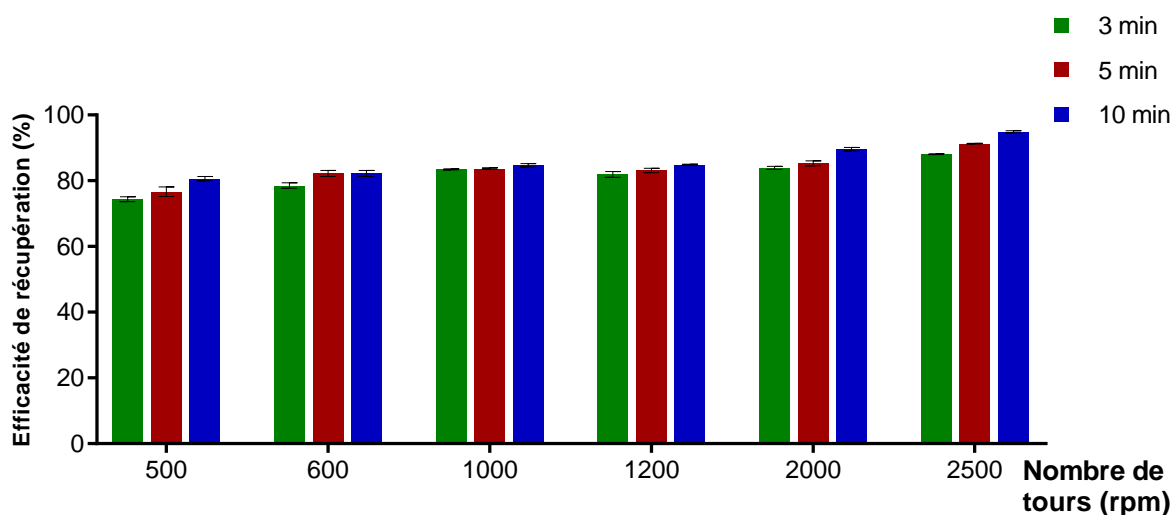


Figure 3.39: Efficacité de la récupération de la biomasse par centrifugation.

VI.1.2. Récolte de la biomasse de *D. salina* DunaDZ1 par floculation

La floculation en fonction du pH est une méthode peu coûteuse pour la récolte de la biomasse des micro-algues. Il est de ce fait intéressant d'évaluer l'efficacité de cette méthode. Des pH acides (4 et 6,5) et basiques (8,5; 10; 10,5; 11,5 et 12) ont été testés sur la biomasse verte de *D. salina* DunaDZ1.

Une récupération de 100 % de biomasse a été obtenue à des pH basiques (10,5; 11,5 et 12). En revanche, à des pH acides l'efficacité atteinte est de $63,65 \pm 0,24$ et $68,3 \pm 0,38$ %, pour des pH de 4 et 6,5, respectivement. A un pH de 10, l'efficacité de récupération est de $86,79 \pm 0,56$ %. A pH 10,5 la récupération totale de la biomasse est atteinte au bout de 35 min seulement, comparativement aux pH 11,5 et 12 (55 min) (figure 3.40). Nous constatons à partir de ces résultats que les pH basiques sont plus efficaces pour la floculation que les pH acides.

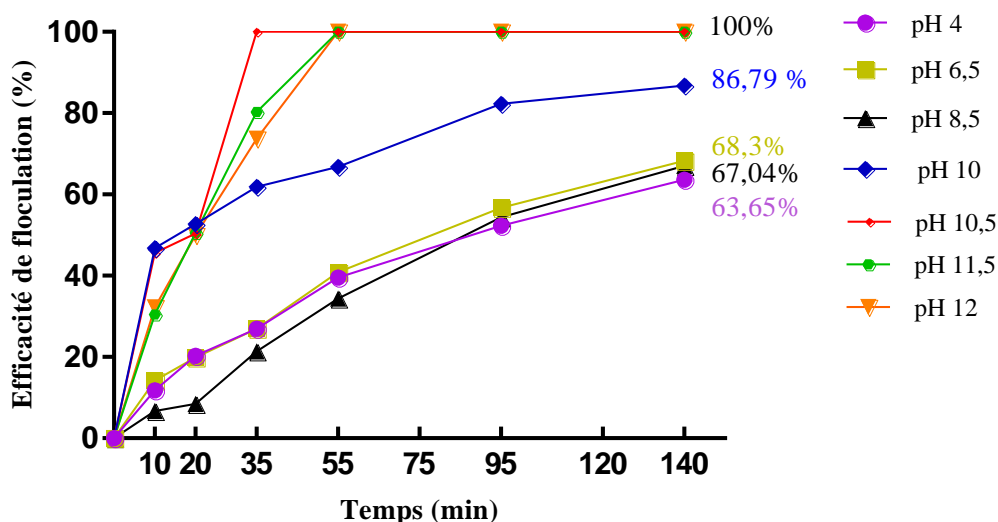


Figure 3.40: Efficacité de floculation en fonction du pH et du temps de la biomasse verte de la souche *D. salina* DunaDZ1.

VI.1.3. Effet des méthodes de récolte sur la qualité nutritionnelle de la biomasse

La caractérisation de la biomasse obtenue par centrifugation (à 2500 rpm pendant 10 min) et floculation (à 10,5) a été réalisée afin de détecter si la qualité de la biomasse a été affectée ou pas par cette technique de récolte. La figure 3.41 montre les taux de protéines et de carbohydrates exprimés en pourcentage de matière sèche.

VI.1.3.1. Effet sur la quantité des protéines et des carbohydrates

La teneur la plus élevée en protéines qui est de $54,51 \pm 0,27$ % de matière sèche (= % MS) a été détectée dans la biomasse récoltée par centrifugation. Cependant, la biomasse récoltée par floculation présente un taux quatre fois plus faible par rapport à la biomasse récoltée par centrifugation, ce taux étant de $13,39 \pm 0,13$ % MS (figure 3.41).

Comme pour les protéines, la teneur en carbohydrates est aussi affectée par la floculation. Le taux de carbohydrates est de $3,02 \pm 0,22$ % MS pour la biomasse récoltée par floculation et de $18,13 \pm 1,11$ % MS pour la biomasse récoltée par centrifugation.

VI.1.3.2. Effet sur le profil des acides gras

Les résultats du profil des acides gras présents dans les biomasses collectées par centrifugation et par floculation sont illustrés dans le tableau 3.12.

Les acides gras majoritaires dans le profil de la biomasse verte de la souche *D. salina* DunaDZ1 sont l'acide palmitique (C16:0) et l'acide caproïque (C6:0). La quantité de ces acides gras est meilleure dans la biomasse récoltée par centrifugation et il en est de même pour les autres acides gras. De ce fait, la biomasse récoltée par centrifugation comporte le taux le plus élevé en acides gras monoinsaturés (14,29%) par comparaison à celle obtenue par floculation à pH 10,5, qui est de 6,83% (tableau 3.13 et figure 3.41). Un acide gras important, l'acide gadoléique (C20:1), n'a pas été détecté dans la biomasse récoltée par floculation. Il en est de même pour les acides gras saturés (61,10% par centrifugation et 49,81% par floculation). Toutes les teneurs en acides gras monoinsaturés sont significativement plus élevées dans la biomasse récoltée par centrifugation. En revanche, les teneurs en acides gras polyinsaturés n'ont été presque pas influencées par la méthode de récolte.

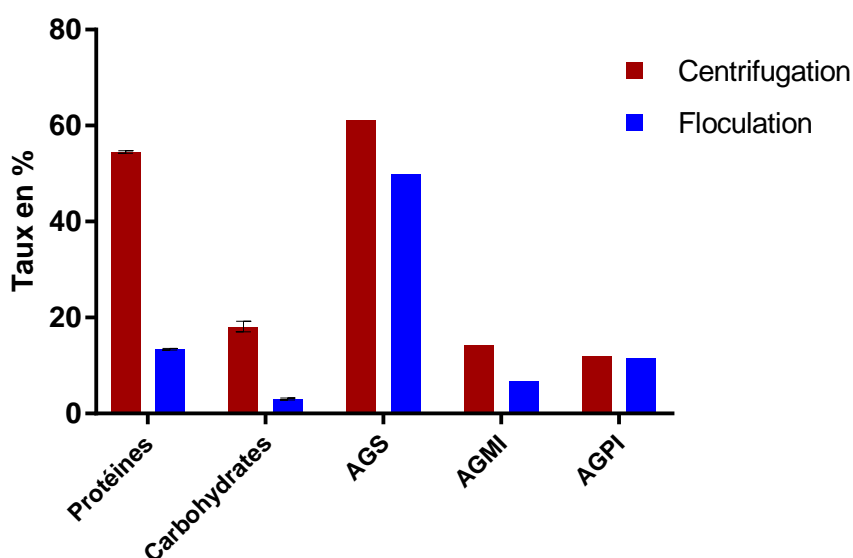


Figure 3.41: Influence de la centrifugation et de la floculation sur la quantité de protéines et de carbohydrates de la souche DunaDZ1.

AGS: acides gras saturés; **AGMI:** acides gras monoinsaturés; **AGPI:** acides gras polyinsaturés.

Floculation: biomasse récoltée par floculation à pH 10,5.

Centrifugation: biomasse récoltée par centrifugation à 2500 rpm pendant 10 min.

Tableau 3.12: Profil des acides gras de la biomasse verte de la souche *D. salina* DunaDZ1 récoltée par centrifugation et par floculation.

Acides gras	Récolte par centrifugation (%)	Récolte par floculation (%)
Acide caproïque C6:0	23,22	17,96
Acide caprique C10:0	0,63	0
Acide laurique C12:0	2,87	2,17
Acide myristique C14:0	2,13	1,9
Acide myristoléique C14:1	1,32	0,34
Acide palmitique C16:0	24,25	20,25
Acide palmitoléique C16:1 n-7	2,9	1,46
Acide stéarique C18:0	7,56	6,53
Acide oléique C18:1 n-9	5,51	2,73
Acide élaidique C18:1 Trans	3,3	2,3
Acide linoléique C 18:2 n-6	2,65	2,33
Acide linolénique C18:3 n-3	9,34	9,19
Acide arachidique C20:0	0,44	0
Acide gadoléique C20:1	1,26	0
Acides gras saturés (AGS)	61,10	49,81
Acides gras monoinsaturés (AGMI)	14,29	6,83
Acides gras polyinsaturés (AGPI)	11,99	11,52

VI.2. Discussion

Le choix de la méthode de récolte des micro-algues dépend de l'espèce étudiée, de la taille cellulaire, de la densité de la biomasse dans le milieu de culture et de la valeur du produit fini désiré (lipides, pigments, composés antioxydants, etc.) [56, 57, 214, 215].

Le coût de la récolte de biomasse représente 20 à 30% du coût total de la production [65, 216]. La quantité de biomasse dans la culture est faible (inférieur à 1 g/L), ce qui rend le processus de récupération de cette biomasse assez coûteux,

d'où la nécessité de développer une méthode efficace et moins chère. Les méthodes de récolte doivent être non toxiques et ne doivent apporter aucune contamination à la biomasse [56].

La centrifugation est une méthode très utilisée pour la récolte de la biomasse de toutes les espèces de micro-algues. Elle présente l'avantage d'être applicable même pour les micro-algues dont la taille cellulaire est petite (3 - 30 μm) [217, 218]. Plusieurs auteurs ont annoncé que la récupération de la biomasse par centrifugation peut être très élevée (> 90%) quand de fortes rotations par minute sont appliquées [66]. Nous avons constaté qu'à des nombres de rotations élevés (supérieurs à 2500 rpm) l'intégrité de la souche est touchée et la plupart de ses cellules ont éclaté. Dans cette étude une meilleure récupération a été obtenue à une rotation de 2500 rpm pendant 10 min. Ces résultats sont comparables à ceux de Heasman *et al.* [66].

Heasman *et al.* [66] ont évalué la récolte par centrifugation de 9 espèces de micro-algues. Ils ont enregistré une récupération de biomasse de 60 et de 100 % pour des rotations de 1300 et 13 000 rpm, respectivement. A une récupération de 100 % de biomasse, le taux de viabilité des cellules était de 88,92 %, pour deux espèces de micro-algues, *Pavlova lutheri* et *Isochrysis* sp.. Les résultats obtenus par centrifugation sont aussi dépendants des espèces de micro-algues à récupérer. Il n'existe pas une méthode de récolte universelle qui pourrait être appliquée pour toutes les souches de micro-algues, en donnant les mêmes résultats [65].

En comparaison avec d'autres méthodes de récolte, la centrifugation offre plusieurs avantages: le taux de biomasse récupéré est élevé, la biomasse obtenue est exempte de résidus de produits chimiques et/ou de produits toxiques (cas de la floculation en utilisant des produits chimiques) et la composition des cellules n'est pas altérée [219].

En revanche, une récupération totale de la biomasse a été obtenue dans notre cas par floculation en augmentant le pH au-delà de 10,5 à l'aide de NaOH. La floculation est obtenue en fonction du pH, mais aussi de la densité des cellules et de la concentration des ions Mg^{2+} dans le milieu de culture [220].

La floculation de la biomasse est achevée quand des pH basiques sont appliqués. Dans l'eau naturelle, les micro-algues sont chargées négativement, ce qui

empêche les cellules de se joindre. Quand le NaOH est ajouté pour atteindre des pH basiques de 10, 11 ou 12, une quantité importante de charges positives est ajoutée dans le milieu provoquant ainsi une neutralisation du milieu. La force de répulsion entre les cellules devient nulle, ce qui permet à ces dernières de former des agrégats appelés floc. Le floc ainsi formé précipite par la suite, après la précipitation des ions Mg^{2+} et Ca^{2+} qui se trouvent dans le milieu [221].

Une étude a été menée par Pirwitz *et al.* [222] sur la floculation due au pH de la micro-algue *Dunaliella salina* CCAP 19/18. Cette étude a abouti à un maximum de récupération à un pH de 12, ces résultats étant supérieurs à ceux trouvés dans cette étude. Les auteurs ont constaté que la floculation a donné des résultats similaires pour la phase verte et la phase orange.

Pérez *et al.* [221] ont enregistré une récupération totale de la biomasse à partir d'un pH de 11 pour la diatomée *Skeletonema costatum*, tandis que pour la diatomée *Chaetoceros gracilis*, une récupération de 100% a été enregistrée pour des pH supérieurs à 10,5.

La qualité de la biomasse obtenue doit être prise en considération lors du choix de la méthode de récolte. Cette qualité ne doit pas être affectée, ni contenir des éléments toxiques. En revanche, dans notre étude, les taux de protéines et de carbohydrates ont été largement affectés par la floculation. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que le NaOH interagit avec les cellules de la souche DunaDZ1 en se liant à la membrane cellulaire formant ainsi une couche, ce qui rend difficile la pénétration des solvants d'extraction à l'intérieur de la cellule, d'où l'obtention de taux assez faible de protéines et de carbohydrates [222, 223].

Les taux d'acides gras dans la biomasse récoltée par floculation ont aussi été affectés, ce qui montre que l'usage du NaOH n'est pas adéquat. Borges *et al.* [224] ont réalisé une étude sur la floculation de la biomasse de la micro-algue marine *Nannochloropsis oculata* en calibrant le pH par l'ajout du NaOH. Ces auteurs ont montré que certains acides gras importants, tels l'acide eicosapentaénoïque (C 20:5) et l'acide eicosatetraénoïque (C 20:4), ont disparu de la biomasse récoltée par floculation. Ils ont également montré que les taux de lipides sont largement affectés par l'ajout du NaOH, avec des teneurs dix fois moindres que le témoin (biomasse récupérée par centrifugation).

VII. QUANTIFICATION DES PIGMENTS CAROTENOIDES APRES EXTRACTION ASSISTEE PAR ULTRASONS ET PAR LIQUIDES PRESSURISES

VII.1. Résultats

La caractérisation des différents extraits obtenus à partir des biomasses verte et orange de la souche DunaDZ1 a été effectuée. Cinq solvants ont été testés pour la méthode d'extraction par ultrasons (UAE) et quatre solvants pour la méthode d'extraction par liquides pressurisés (PLE).

Différentes températures d'extractions ont été testées pour l'extraction par PLE (90, 120 et 150°C) et une seule température pour l'extraction par UAE (50°C). Les solvants testés pour les deux méthodes d'extraction ont des polarités différentes. Les rendements obtenus par l'extraction UAE et PLE à partir de chaque biomasse sont présentés dans les tableaux 3.13 et 3.14.

VII.1.1. Rendements de l'extraction assistée par ultrasons (UAE)

Les meilleurs rendements d'extraction par UAE sont obtenus par le mélange *n*-hexane:éthanol (3:4), qui sont de $4,41 \pm 0,03$ et $3,37 \pm 0,01$ % pour les biomasses verte et orange, respectivement. Le rendement le plus faible pour la biomasse verte est celui obtenu par l'acétate d'éthyle ($1,91 \pm 0,06$ %). Pour la biomasse orange, l'extrait obtenu par l'isobutanol présente le rendement le plus faible ($1,09 \pm 0,08$ %) (tableau 3.14).

Tableau 3.13: Rendements de l'extraction par UAE à partir des biomasses verte et orange de la souche DunaDZ1.

Solvants	Rendement (%)	
	Biomasse verte	Biomasse orange
<i>n</i> -Hexane:éthanol (3:4)	4,41 \pm 0,03	3,37 \pm 0,01
Acétate d'éthyle	1,91 \pm 0,06	1,16 \pm 0,14
Isopropanol	3,27 \pm 0,32	2,00 \pm 0,47
Acétone	2,91 \pm 0,72	2,55 \pm 0,15
Isobutanol	2,54 \pm 0,24	1,09 \pm 0,08

Note: les valeurs représentent la moyenne de deux répétitions \pm l'écart-type.

VII.1.2. Rendements de l'extraction par liquides pressurisés (PLE)

Les rendements obtenus par la technique PLE sont tributaires de la température et du solvant. Ils augmentent avec l'augmentation de la température. De meilleurs rendements sont obtenus avec l'éthanol à une température de 150°C et ceci pour les deux biomasses étudiées, verte ($17,83 \pm 0,63$ %) et orange ($8,68 \pm 0,16$ %). Le mélange *n*-hexane:éthanol a donné des rendements moyens, allant de $9,62 \pm 1,49$ à $13,37 \pm 0,48$ % pour la biomasse verte et de $5,39 \pm 0,4$ à $7,13 \pm 0,31$ % pour la biomasse orange. Des rendements faibles sont obtenus en utilisant le *n*-hexane (2,01 à 3,22%) et l'acétate d'éthyle (2,01 à 3,50%).

L'extraction par la technique PLE a abouti à une amélioration des rendements comparativement à l'extraction par UAE. L'extraction PLE par le mélange *n*-hexane:éthanol (3:4) a donné des rendements deux à trois fois supérieurs à ceux obtenus par la technique UAE en utilisant le même mélange de solvants (tableau 3.15).

Tableau 3.14: Rendements de l'extraction par PLE à partir des biomasses verte et orange de la souche DunaDZ1.

Solvants	Température (°C)	Rendement (%)	
		Biomasse verte	Biomasse orange
Ethanol	90	$13,36 \pm 0,15$	$8,03 \pm 0,12$
	120	$15,63 \pm 0,17$	$8,21 \pm 1,91$
	150	$17,83 \pm 0,63$	$8,68 \pm 0,16$
<i>n</i> -Hexane	90	$2,61 \pm 0,25$	$2,01 \pm 0,03$
	120	$2,7 \pm 0,67$	$2,04 \pm 0,45$
	150	$3,22 \pm 0,13$	$2,33 \pm 0,34$
<i>n</i> -Hexane:éthanol (3:4)	90	$9,62 \pm 1,49$	$5,39 \pm 0,4$
	120	$11,11 \pm 0,22$	$6,56 \pm 0,17$
	150	$13,37 \pm 0,48$	$7,13 \pm 0,31$
Acétate d'éthyle	90	$3,94 \pm 0,38$	$2,71 \pm 0,32$
	120	$4,86 \pm 0,47$	$2,85 \pm 0,04$
	150	$6,31 \pm 0,51$	$3,50 \pm 0,18$

Note: les valeurs sont la moyenne de deux répétitions \pm l'écart-type.

VII.1.3. Caractérisation des extraits par CCM

VII.1.3.1. Extraits obtenus par la technique d'extraction assistée par ultrasons

L'analyse par CCM a permis de séparer les différents pigments présents dans les biomasses étudiées (verte et orange). Les résultats sont illustrés dans les figures 3.42 et 3.43.

Plusieurs spots verts représentatifs des pigments chlorophylliens ont été révélés sur la plaque de CCM de la biomasse verte. Nous constatons la présence de quelques pigments caroténoïdes, notamment le β -carotène. L'extrait à l'acétate d'éthyle est le plus concentré en pigments caroténoïdes et en pigments chlorophylliens.

En revanche, des spots caractéristiques de couleur grisâtre à gris sont mis en évidence dans les extraits à l'acétate d'éthyle (surtout) et à l'acétone. Selon la littérature, ces composés sont des phéophytines (*a* et *b*) et des pyropheophytines (voir discussion). Ce sont des composés issus de la dégradation de la chlorophylle, notamment quand l'extraction est réalisée en utilisant certains solvants organiques et à haute température.

L'analyse par CCM de la biomasse orange de la souche *D. salina* DunaDZ1 a montré plusieurs spots représentatifs des pigments caroténoïdes. Le β -carotène ($R_f \sim 0,95$) est le pigment majoritaire, avec une intensité plus forte dans l'extrait à l'acétate d'éthyle. Plusieurs spots de pigments caroténoïdes non polaires (R_f entre 0,80 et 0,95) ont été observés, encore plus pour l'extrait obtenu à l'acétate d'éthyle. Ces composés peuvent être l' α -carotène et des isomères du β -carotène.

Dans la biomasse orange, les pigments chlorophylliens ont presque disparu. Nous remarquons la présence des composés issus de la dégradation de la chlorophylle (R_f entre 0,75 et 0,85) pour tous les extraits avec une faible intensité.

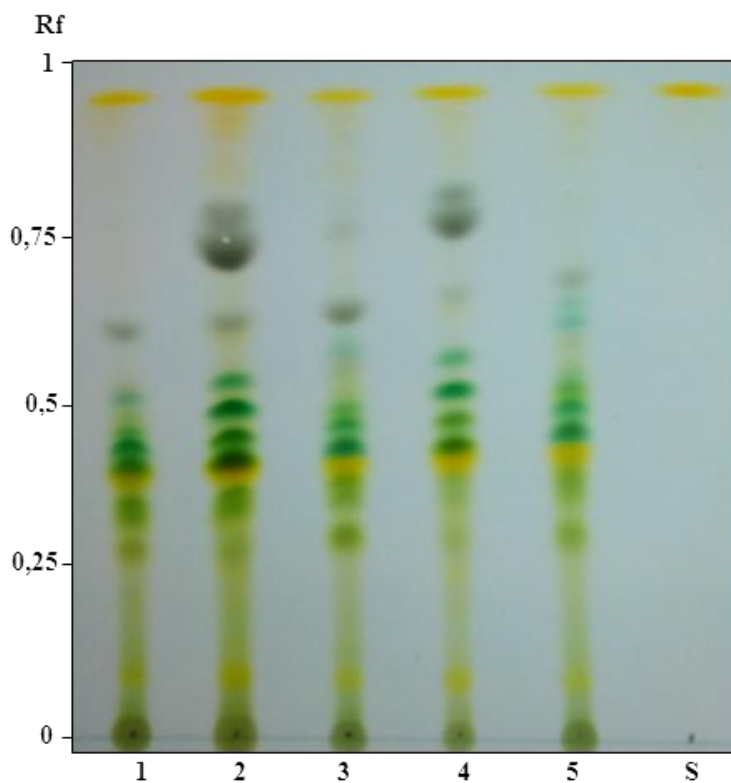


Figure 3.42: Chromatographie sur couche mince des différents extraits obtenus par extraction assistée par ultrasons (UAE) à partir de la biomasse verte de la souche *D. salina* DunasDZ1 (photographie originale).

Rf: rapport frontal. Solvant de migration: éther de pétrole-acétone (3:1 v/v).

Extraits: **1:** *n*-hexane:éthanol (3:4), **2:** acétate d'éthyle, **3:** isopropanol, **4:** acétone, **5:** isobutanol. Le standard (**S**) est le β -carotène à 5 mg/mL.

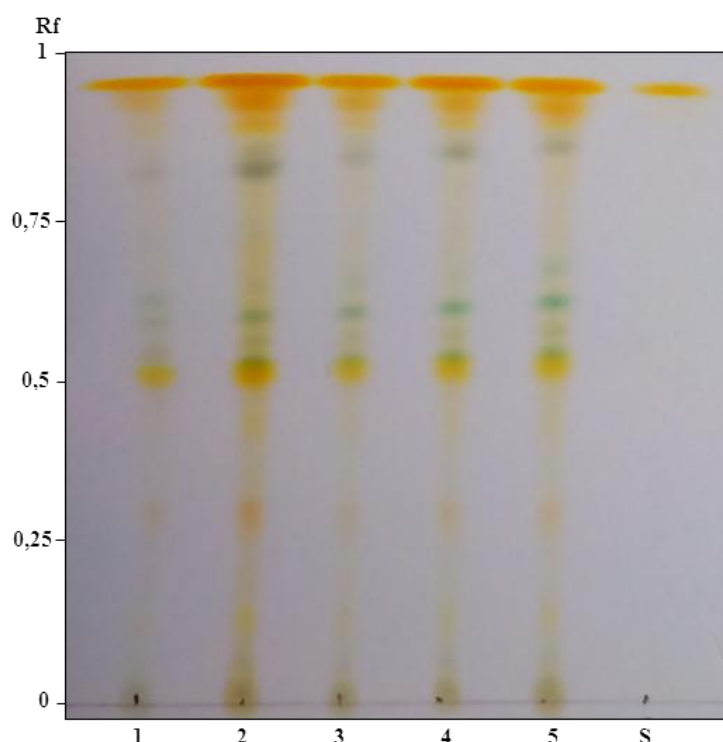


Figure 3.43: Chromatographie sur couche mince des différents extraits obtenus par extraction assistée par ultrasons à partir de la biomasse orange de la souche *D. salina* DunaDZ1 (photographie originale).

Rf: rapport frontal. Solvant de migration: éther de pétrole-acétone (3:1 v/v).

Extraits: **1:** *n*-hexane:éthanol (3:4), **2:** acétate d'éthyle, **3:** isopropanol, **4:** acétone, **5:** isobutanol. Le standard (**S**) est le β -carotène à 5 mg/mL.

VII.1.3.2. Extraits obtenus par la technique d'extraction par liquides pressurisés

La chromatographie sur couche mince des extraits obtenus par PLE a permis de séparer les différents pigments présents dans les biomasses étudiées (verte et orange). Les résultats sont illustrés dans les figures 3.44 et 3.45.

A partir de la biomasse verte, plusieurs spots majoritaires de couleur verte caractéristiques des pigments chlorophylliens ont été révélés dans tous les extraits obtenus par PLE et pour toutes les températures testées. L'intensité de la couleur de ces spots est nettement forte dans les extraits obtenus au *n*-hexane et à l'acétate d'éthyle.

Des spots grisâtres (phéophytines) de forte intensité et à différents Rf sont présents dans les extraits obtenus au *n*-hexane et à l'acétate d'éthyle. L'intensité de ces spots augmente avec la température.

Quelques spots caractéristiques des pigments caroténoïdes ont aussi été révélés à partir de la biomasse verte, le β -carotène comme étant le pigment majoritaire. Les spots de β -carotène détectés dans l'extrait au *n*-hexane à différentes températures d'extractions sont les plus intenses.

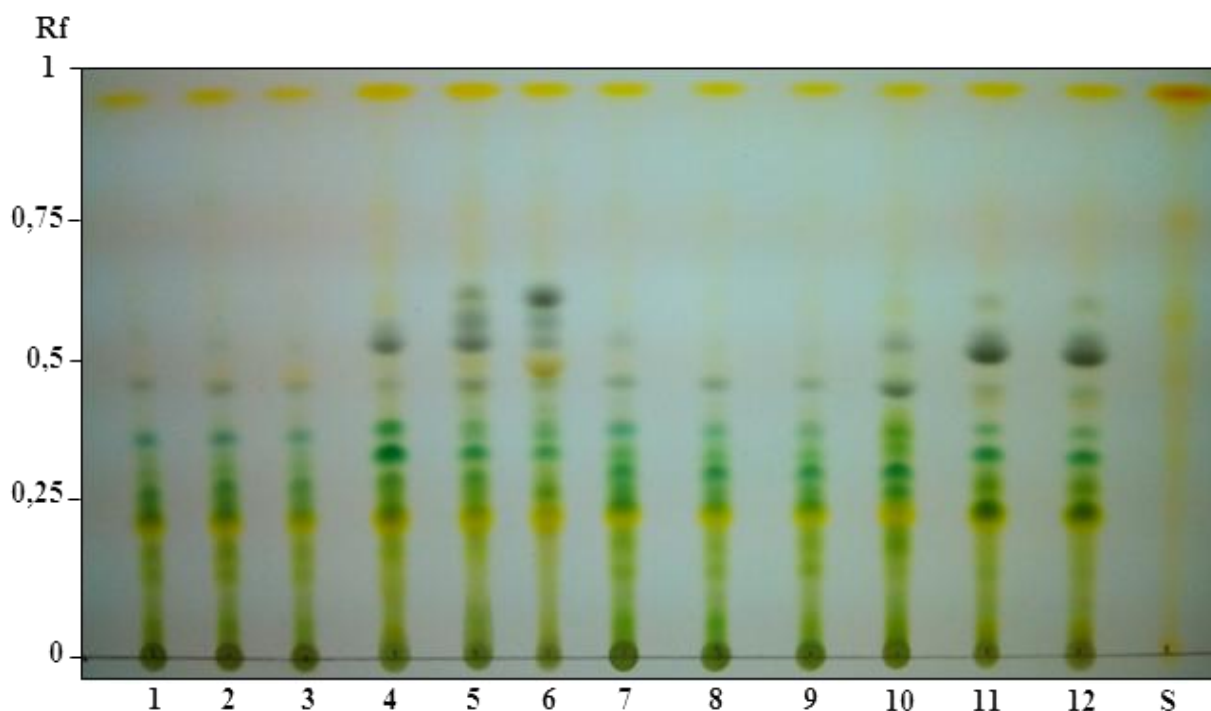


Figure 3.44: Chromatographie sur couche mince des différents extraits obtenus par extraction par liquide pressurisé à partir de la biomasse verte de la souche *D. salina* DunaDZ1 (photographie originale).

Rf: rapport frontal. Solvant de migration: éther de pétrole-acétone (3:1 v/v).

Extraits: **1:** éthanol à 90°C, **2:** éthanol à 120°C, **3:** éthanol à 150°C, **4:** *n*-hexane à 90°C, **5:** *n*-hexane à 120°C, **6:** *n*-hexane à 150°C, **7:** *n*-hexane:éthanol (3:4) à 90°C, **8:** *n*-hexane:éthanol (3:4) à 120°C, **9:** *n*-hexane:éthanol (3:4) à 150°C, **10:** acétate d'éthyle à 90°C, **11:** acétate d'éthyle à 120°C, **12:** acétate d'éthyle à 150°C. Le standard (**S**) est le β -carotène à 5 mg/mL.

En revanche, l'analyse par CCM de la biomasse orange a révélé la présence de nombreux pigments caroténoïdes présentant différentes polarités. Le pigment caroténoïde majoritaire est le β -carotène ($R_f \sim 0,9$) dont l'intensité diffère d'un solvant à un autre.

Par ailleurs, nous constatons presque la disparition des pigments chlorophylliens. Les produits de dégradation de la chlorophylle (spots grisâtres à R_f au voisinage de

0,5) sont présents dans les extraits obtenus à partir de la biomasse orange, mais à de faibles quantités comparativement aux extraits de la biomasse verte.

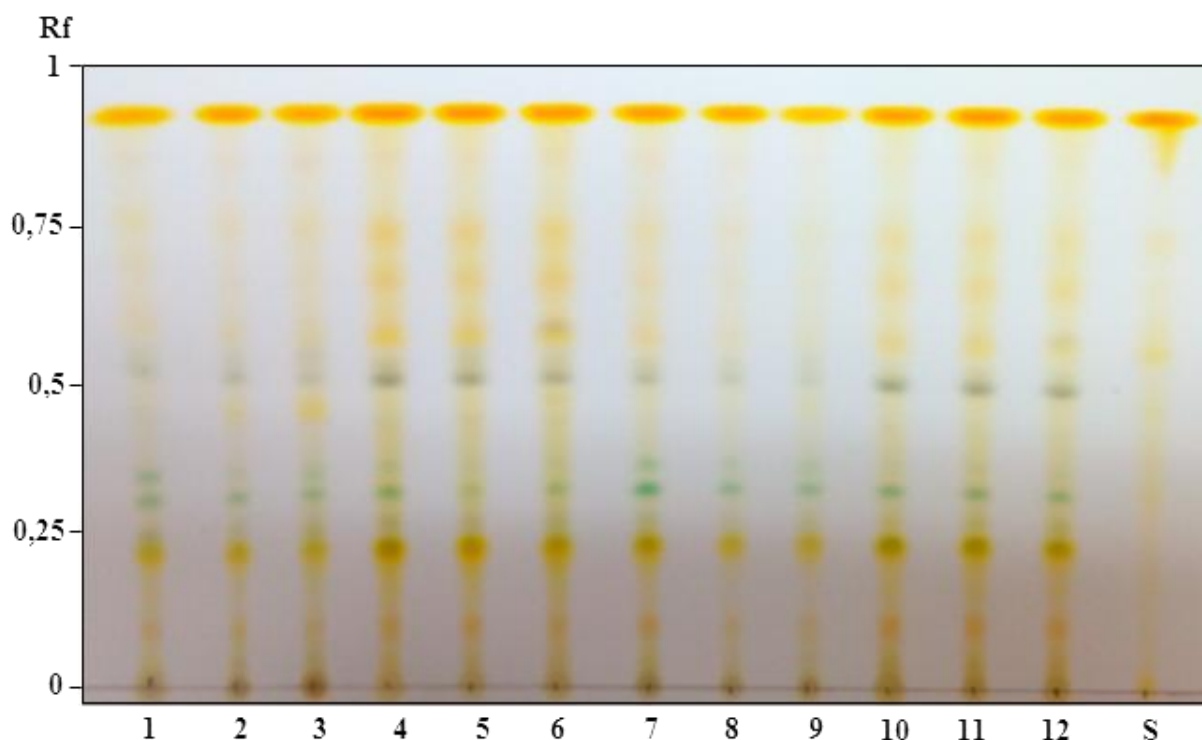


Figure 3.45: Chromatographie sur couche mince des différents extraits obtenus par extraction par liquide pressurisé à partir de la biomasse orange de la souche *D. salina* DunaDZ1 (photographie originale).

Rf: rapport frontal. Solvant de migration: éther de pétrole-acétone (3:1 v/v).

Extraits: **1:** éthanol à 90°C, **2:** éthanol à 120°C, **3:** éthanol à 150°C, **4:** *n*-hexane à 90°C, **5:** *n*-hexane à 120°C, **6:** *n*-hexane à 150°C, **7:** *n*-hexane:éthanol (3:4) à 90°C, **8:** *n*-hexane:éthanol (3:4) à 120°C, **9:** *n*-hexane:éthanol (3:4) à 150°C, **10:** acétate d'éthyle à 90°C, **11:** acétate d'éthyle à 120°C, **12:** acétate d'éthyle à 150°C. Le standard (**S**) est le β -carotène à 5 mg/mL.

VII.1.4. Caractérisation des extraits par HPLC-DAD

Les résultats de la caractérisation par HPLC-DAD des extraits obtenus par les méthodes d'extraction UAE et PLE sont présentés dans les figures 3.46, 3.48, 3.50, 3.51 et les tableaux 3.15, 3.16, 3.17, 3.18. La quantification des pigments caroténoïdes a été faite en se référant à une courbe d'étalonnage (annexe 4). L'identification des fractions correspondant aux différents pics a été faite sur la base des temps de rétention (dans des conditions bien définies) et des spectres UV-visible.

VII.1.4.1. Pigments caroténoïdes présents dans les extraits de la biomasse verte obtenus par la technique d'extraction assistée par ultrasons (UAE)

Plusieurs pics ont été mis en évidence dans tous les extraits obtenus par la technique UAE de la biomasse verte. Quelques pics (notés pics 5) sont caractéristiques des pigments chlorophylliens, tandis que d'autres sont caractéristiques des pigments caroténoïdes. Deux familles de pigments caroténoïdes sont présentes: les xanthophylles telles que la violaxanthine (pic 1), la lutéine (pic 2) et la zéaxanthine (pic 3), et les carotènes, tels que l' α -carotène (pic 6) et le β -carotène (pic 7) (figure 3.46). Leurs spectres UV-visible sont présentés dans la figure 3.47.

Le tableau 3.15 donne la composition en pigments caroténoïdes des extraits obtenus par UAE à partir de la biomasse verte de la souche DunaDZ1.

Le pigment caroténoïde majoritaire est la lutéine. La teneur la plus élevée est enregistrée dans l'extrait à l'acétate d'éthyle (393,19 mg/g). La lutéine est suivie par la violaxanthine avec la teneur la plus élevée obtenue dans l'extrait à l'acétate d'éthyle (131,43 mg/g).

L' α -carotène est présent dans la biomasse verte avec des valeurs moyennes qui oscillent de 39,49 mg/g dans l'extrait à l'isopropanol à 62,63 mg/g dans celui à l'acétate d'éthyle. Les teneurs qui ont été enregistrées pour le β -carotène varient de 38,53 mg/g (pour l'isopropanol) à 72,65 mg/g (pour l'acétate d'éthyle).

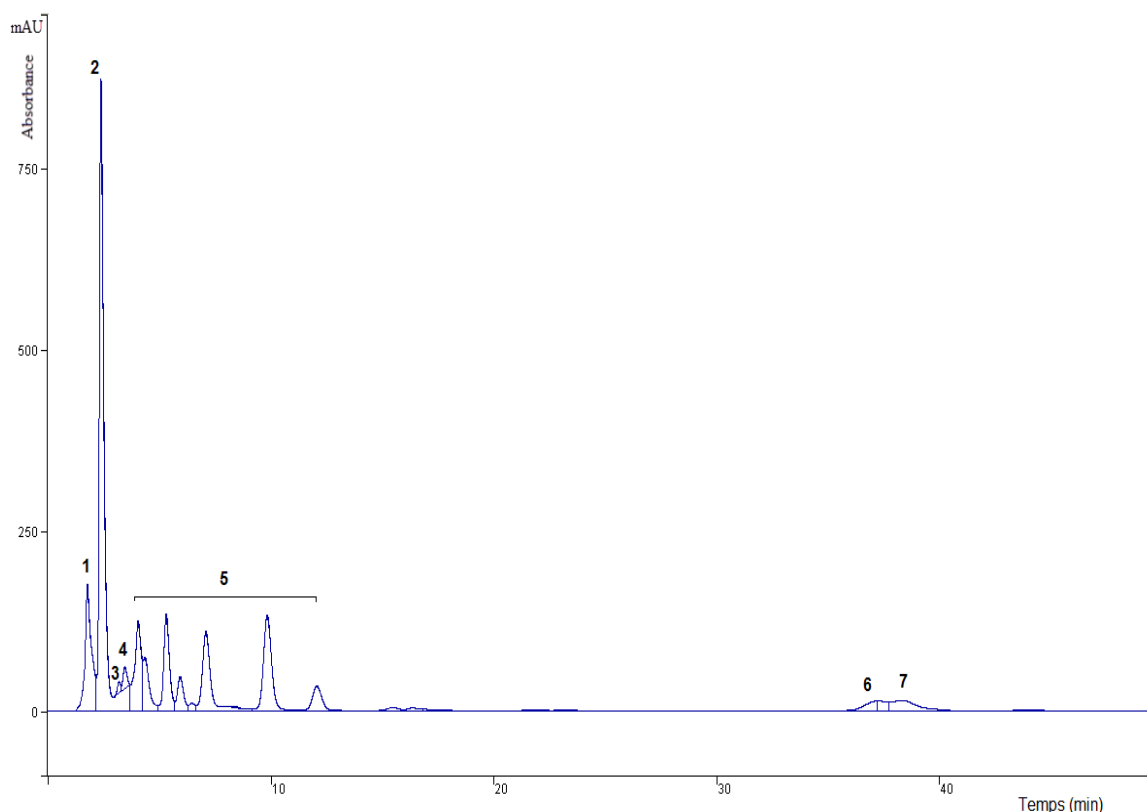


Figure 3.46: Profil du chromatogramme de l'extrait obtenu à l'acétate d'éthyle de la biomasse verte de la souche *D. salina* DunaDZ1 en utilisant la méthode d'extraction assistée par ultrasons à 50°C, pendant 30 min.

pic 1: violaxanthine; **pic 2:** lutéine; **pic 3:** zéaxanthine; **pic 4:** pigment caroténoïde non identifié; **pics 5:** pigments chlorophylliens et phéophytines; **pic 6:** α -carotène; **pic 7:** β -carotène.

Conditions: colonne Eclipse XDB C18 (150 × 4,6 mm; granulométrie 5 μ m); phase mobile, méthanol à 100%, temps 50 min; débit 1,5 mL/min; longueur de détection 450 nm.

La reconnaissance des pics a été faite par les spectres UV-visible.

Remarque: les pics 5 correspondant aux pigments chlorophylliens de la biomasse verte sont relativement petits. Ceci s'explique par la longueur de détection par HPLC qui est de 450 nm (favorable pour les pigments caroténoïdes mais pas pour les pigments chlorophylliens).

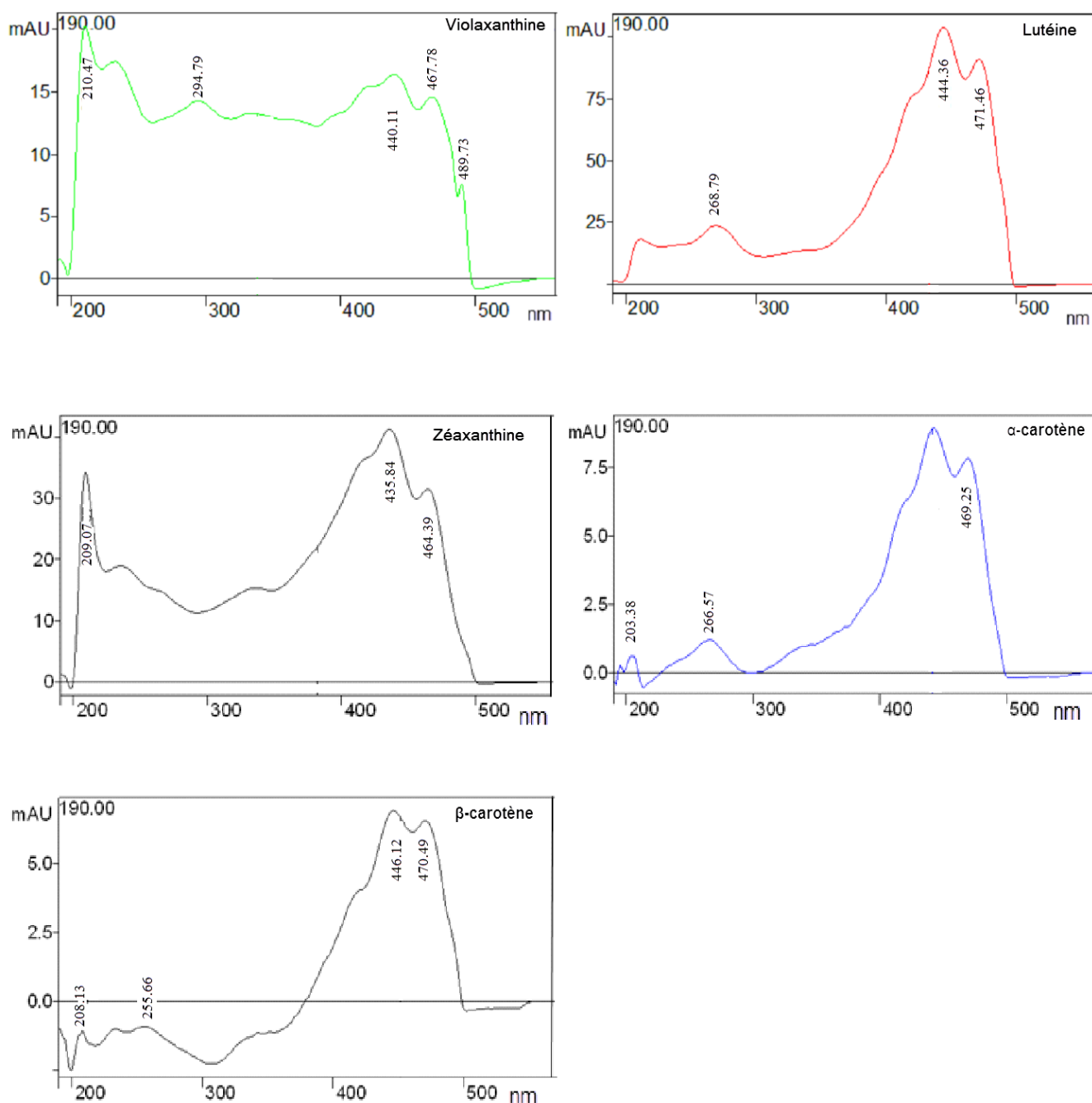


Figure 3.47: Spectres UV-visible des pigments caroténoïdes de la souche *D. salina* DunaDZ1 dissous dans le méthanol.

Tableau 3.15: Composition en pigments caroténoïdes des extraits obtenus par UAE à partir de la biomasse verte de la souche *D. salina* DunaDZ1. Les résultats sont exprimés en milligramme par gramme (mg/g) d'extrait sec.

Pigment Extrait	Violaxanthine	Lutéine	Zéaxanthine	PNI*	α-carotène	β-carotène
<i>n</i> -Hexane:éthanol (3:4)	66,47	161,76	37,50	36,64	47,58	43,64
Acétate d'éthyle	131,43	393,19	39,57	45,91	62,63	72,65
Isopropanol	117,55	301,43	75,20	57,31	39,49	38,53
Acétone	106,58	291,53	38,90	42,34	61,81	60,45
Isobutanol	78,56	195,78	38,80	35,92	49,21	42,18

*PNI: pigment caroténoïde non identifié.

VII.1.4.2. Pigments caroténoïdes présents dans les extraits de la biomasse orange obtenus par la technique d'extraction assistée par ultrasons

Plusieurs pigments caroténoïdes ont été révélés dans les extraits obtenus par différents solvants à partir de la biomasse orange de la souche *D. salina* DunaDZ1 (figure 3.48; tableau 3.16).

Le pigment majoritaire révélé est le *trans*, β -carotène suivi par le *cis*, β -carotène, dont les spectres UV-visible sont illustrés dans la figure 3.49. La teneur maximale en *trans*, β -carotène (131,83 mg/g) est obtenue à partir de l'extrait acétonique. La teneur la plus faible (81,30 mg/g) est enregistrée dans l'extrait à l'isopropanol. En revanche, l'extrait isobutanolique contient la teneur la plus élevée en *cis*, β -carotène (84,21 mg/g).

L' α -carotène est également présent dans la biomasse orange extraite par UAE. Les teneurs sont inférieures à celles du β -carotène, variant de 45,77 mg/g pour l'isobutanol à 38,37 mg/g pour l'acétate d'éthyle (tableau 3.16). Deux autres pigments caroténoïdes appartenant à la famille des xanthophylles, à savoir la lutéine et la violaxanthine, ont été décelés.

Deux pigments caroténoïdes non identifiés (notés PNI n°1 et PNI n°2) sont présents dans la biomasse orange; leur quantité oscille entre 35,73 et 51,58 mg/g (tableau 3.16).

Tableau 3.16: Composition en pigments caroténoïdes des extraits obtenus par UAE à partir de la biomasse orange de la souche *D. salina* DunaDZ1. Les résultats sont exprimés en milligramme par gramme (mg/g) d'extrait sec.

Extrait \ Pigment	Violaxanthine	Lutéine	PNI* n°1	PNI* n°2	α-carotène	Cis,β-carotène	Trans,β-carotène
<i>n</i> -Hexane:éthanol (3:4)	42,12	68,31	43,19	35,73	43	61,06	118,38
Acétate d'éthyle	42,52	77,52	43,88	35,73	38,37	63,01	114,04
Isopropanol	40,50	60,82	41,88	37,40	41,22	53,39	81,30
Acétone	41,01	64,10	40,74	35,73	40,82	58,50	131,83
Isobutanol	43,62	74,38	51,58	38,13	45,77	84,21	114,54

*PNI n°1 et PNI n°2: pigments caroténoïdes non identifiés.

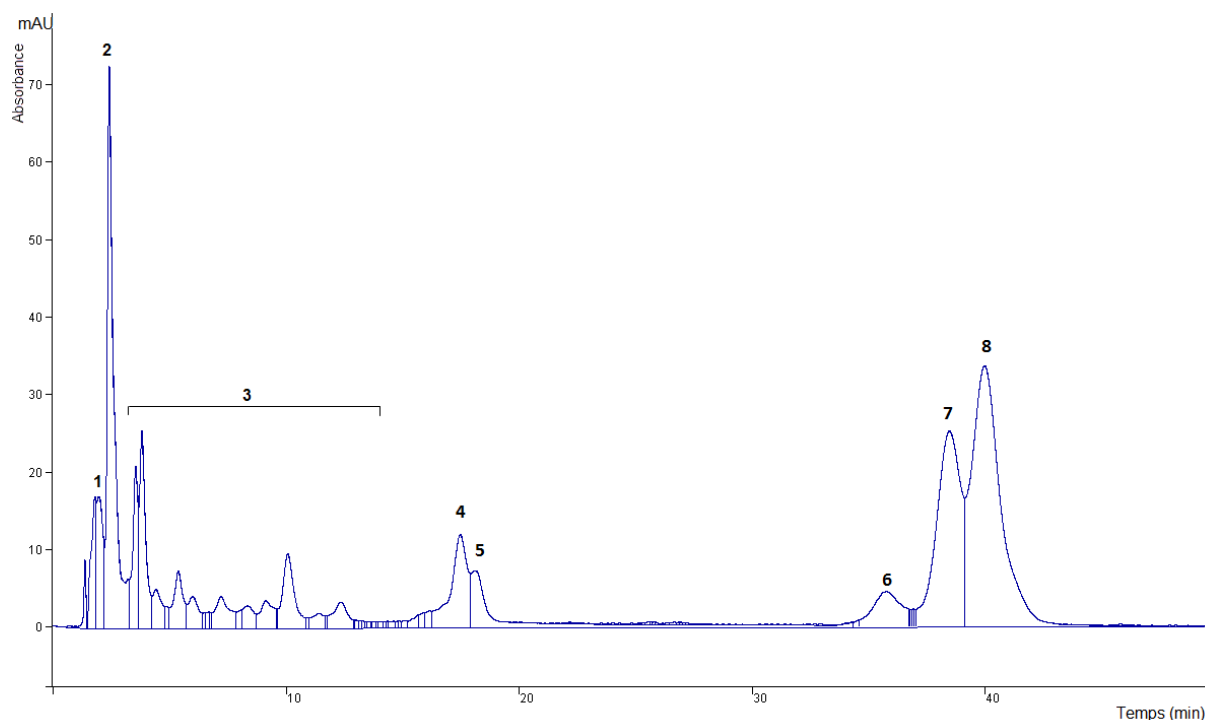


Figure 3.48: Profil du chromatogramme de l'extrait isobutanolique de la biomasse orange de la souche *D. salina* DunaDZ1 en utilisant la méthode d'extraction assistée par ultrasons à 50°C, pendant 30 min.

pic 1: violaxanthine; **pic 2:** lutéine; **pics 3:** pigments chlorophylliens et phéophytines; **pics 4 et 5:** pigments caroténoïdes non identifiés; **pic 6:** α -carotène; **pic 7:** *cis*, β -carotène; **pic 8:** *trans*, β -carotène.

Conditions: colonne Eclipse XDB C18 (150 \times 4,6 mm; granulométrie 5 μ m); phase mobile, méthanol à 100%, temps 50 min; débit 1,5 mL/min; longueur de détection 450 nm.

La reconnaissance des pics a été faite par les spectres UV-visible.

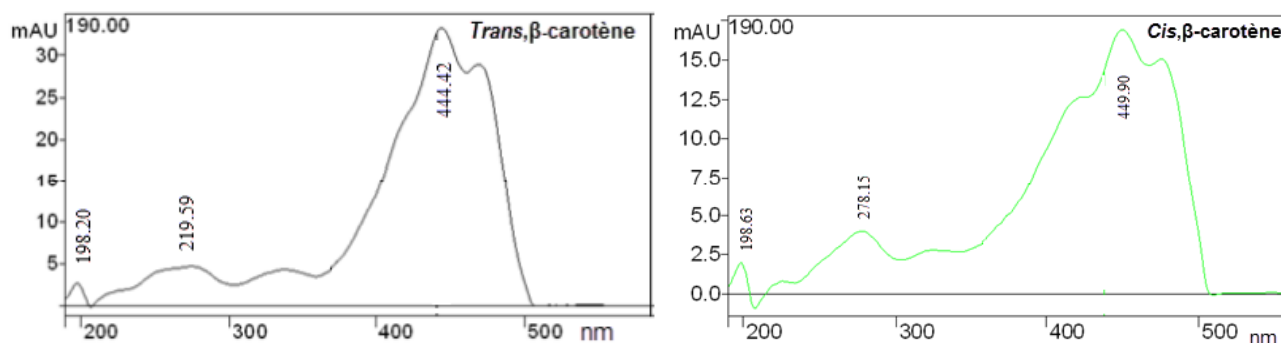


Figure 3.49: Spectres UV-visible du *trans*, β -carotène et du *cis*, β -carotène de la souche *D. salina* DunaDZ1 dissous dans le méthanol.

VII.1.4.3. Pigments caroténoïdes présents dans les extraits de la biomasse verte obtenus par la technique d'extraction par liquides pressurisés

L'extraction par liquides pressurisés à partir des biomasses verte et orange de la souche *D. salina* DunaDZ1 a été réalisée en utilisant trois températures d'extraction (90, 120 et 150°C) et quatre solvants [l'éthanol, le *n*-hexane, le *n*-hexane:éthanol (3:4) et l'acétate d'éthyle]. Les résultats sont présentés dans la figure 3.50 et le tableau 3.17.

La figure montre la présence de six pigments caroténoïdes ainsi que des pigments chlorophylliens et phéophytines dans la biomasse verte de la souche *D. salina* DunaDZ1. Le tableau 3.17 montre que la lutéine est le pigment majoritaire dans tous les extraits obtenus à partir de la biomasse verte, avec une valeur maximale de 279,67 mg/g dans l'extrait au *n*-hexane à une température d'extraction de 90°C. Cependant, plus la température d'extraction augmente, plus les teneurs en lutéine diminuent. La même remarque est constatée pour la violaxanthine, dont la teneur la plus élevée (91,69 mg/g) est retrouvée dans l'extrait hexanique à 90°C. En revanche, la teneur en zéaxanthine présente aussi dans la biomasse verte n'est pas affectée par l'augmentation de la température. L'extrait de ce pigment obtenu par le mélange *n*-hexane:éthanol (3:4) à une température d'extraction de 150°C est le plus riche (66,04 mg/g).

Des pigments caroténoïdes appartenant à la famille des carotènes ont été obtenus: l' α -carotène et le β -carotène. En général, plus la température d'extraction augmente plus la quantité de carotènes (α et β) augmente pour tous les solvants testés, à l'exception de l'extrait hexanique, dont la teneur la plus élevée est obtenue à une température de 90°C.

La teneur la plus élevée en β -carotène de la biomasse verte est celle obtenue par l'extraction à l'acétate d'éthyle à 150°C (56,37 mg/g). La valeur la plus élevée de l' α -carotène est celle trouvée dans l'extrait hexanique à 90°C (62,63 mg/g).

Un pigment caroténoïde non identifié (pic 4) est présent dans le profil chromatographique de la biomasse verte; sa quantité varie en fonction du solvant et de la température d'extraction. Ce pigment semble être le même que celui observé

dans la biomasse verte extraite par les ultrasons, et ce, au vu de son temps de rétention.

Différents pigments chlorophylliens et phéophytines (pics 5) ont été détectés (figure 3.50). Ces résultats sont en accord avec les données obtenues par la CCM.

Tableau 3.17: Composition en pigments caroténoïdes des extraits obtenus par PLE à partir de la biomasse verte de la souche *D. salina* DunaDZ1. Les résultats sont exprimés en milligramme par gramme (mg/g) d'extrait sec.

Extrait \ Pigment	Violaxanthine	Lutéine	zéaxanthine	PNI*	α-carotène	β-carotène
Ethanol 90°C	52,27	157,66	45,27	35,79	41,41	37,70
Ethanol 120°C	36,22	107,48	35,86	35,73	40,79	37,60
Ethanol 150°C	46,47	49,50	46,68	40,29	44,12	45,91
<i>n</i> -Hexane 90°C	91,69	279,67	39,14	43,83	62,63	54,40
<i>n</i> -Hexane 120°C	76,43	105,78	51,29	45,56	37,30	38,08
<i>n</i> -Hexane 150°C	78,08	115,37	51,98	43,46	37,06	38,10
<i>n</i> -Hexane:éthanol 90°C	58,80	127,25	56,13	43,46	47,85	38,90
<i>n</i> -Hexane:éthanol 120°C	50,46	95,53	53,12	43,38	39,99	38,66
<i>n</i> -Hexane:éthanol 150°C	79,76	207,07	66,04	60,18	53,12	48,60
Acétate d'éthyle 90°C	73,39	182,83	39,73	40,79	49,69	44,49
Acétate d'éthyle 120°C	68,17	161,18	39,73	37,60	47,82	48,38
Acétate d'éthyle 150°C	66,68	157,66	38,42	42,15	53,34	56,37

*PNI: pigment caroténoïde non identifié.

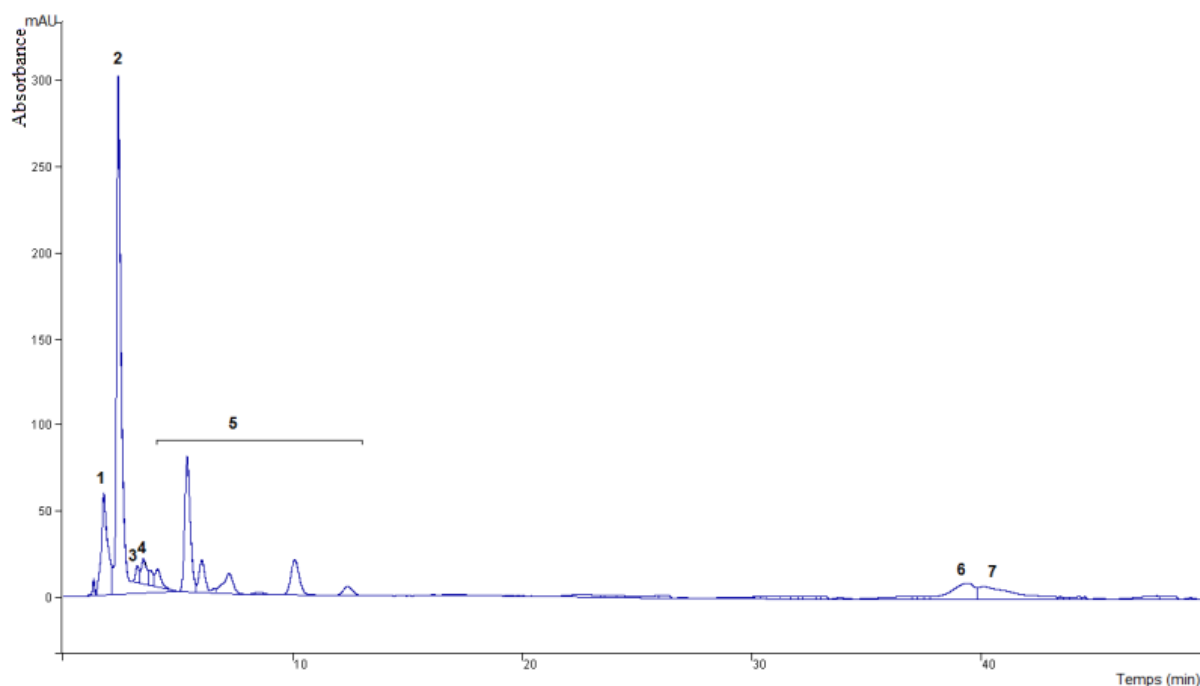


Figure 3.50: Profil du chromatogramme de l'extrait obtenu à l'acétate d'éthyle de la biomasse verte de la souche *D. salina* DunaDZ1 en utilisant la méthode d'extraction par liquides pressurisés à 150°C, pendant 15min.

pic 1: violaxanthine; **pic 2:** lutéine; **pic 3:** zéaxanthine; **pic 4:** pigment caroténoïde non identifié; **pics 5:** pigments chlorophylliens et phéophytines; **pic 6:** α -carotène; **pic 7:** β -carotène.

Conditions: colonne Eclipse XDB C18 (150 × 4,6 mm; granulométrie 5 μ m); phase mobile, méthanol à 100%, temps 50 min; débit 1,5 mL/min; longueur de détection 450 nm.

La reconnaissance des pics a été faite par les spectres UV-visible.

VII.1.4.4. Pigments caroténoïdes présents dans les extraits de la biomasse orange obtenus par la technique d'extraction par liquides pressurisés

Les résultats sont donnés dans la figure 3.51 et le tableau 3.18. Le pigment majoritaire dans tous les extraits obtenus à partir de la biomasse orange de la souche *D. salina* DunaDZ1 est le *trans*, β -carotène. La teneur la plus élevée (357,10 mg/g) est enregistrée dans l'extrait hexanique à une température de 90°C.

L'isomère *cis*, β -carotène a aussi été révélé avec des quantités inférieures comparativement avec l'isomère *trans*, β -carotène, à l'exception de l'extrait éthanolique, dont les teneurs en *cis*, β -carotène dépassent celles du *trans*, β -carotène lorsque l'extraction est faite à des températures élevées (120 et 150°C).

En revanche, plus la température d'extraction augmente et plus les teneurs en pigments caroténoïdes diminuent. Nous constatons que les plus grandes quantités en β -carotène (isomères *cis* et *trans*) sont enregistrées à une température de 90°C, et les teneurs les plus faibles à 150°C.

L' α -carotène est aussi détecté dans tous les extraits, et sa teneur la plus élevée (57,04 mg/g) a été enregistrée dans l'extrait hexanique à 90°C.

La lutéine est un autre pigment caroténoïde présent dans la biomasse orange de la souche *D. salina* DunaDZ1. L'extrait hexanique a enregistré la teneur la plus élevée (102,32 mg/g) à une température de 120°C. Une valeur très proche (101,70 mg/g) est trouvée dans l'extrait à l'acétate d'éthyle à une température de 90°C. La teneur la plus faible en lutéine (42,71 mg/g) est détectée dans l'extrait éthanolique à 150°C.

La violaxanthine a aussi été identifiée dans les extraits obtenus à partir de la biomasse orange. Les quantités de violaxanthine obtenues par différents solvants sont proches, la quantité la plus élevée (47,90 mg/g) étant obtenue dans l'extrait hexanique à 90°C et la plus faible (37,86 mg/g) dans l'extrait au *n*-hexane:éthanol à 150°C.

Deux pigments caroténoïdes non identifiés sont présents dans le profil chromatographique de la biomasse orange, avec des quantités variant de 36,55

mg/g à 51,21 mg/g selon le pigment, le solvant d'extraction et la température d'extraction.

Les pigments chlorophylliens et les phéophytines ont aussi été détectés dans la biomasse orange (pics 3).

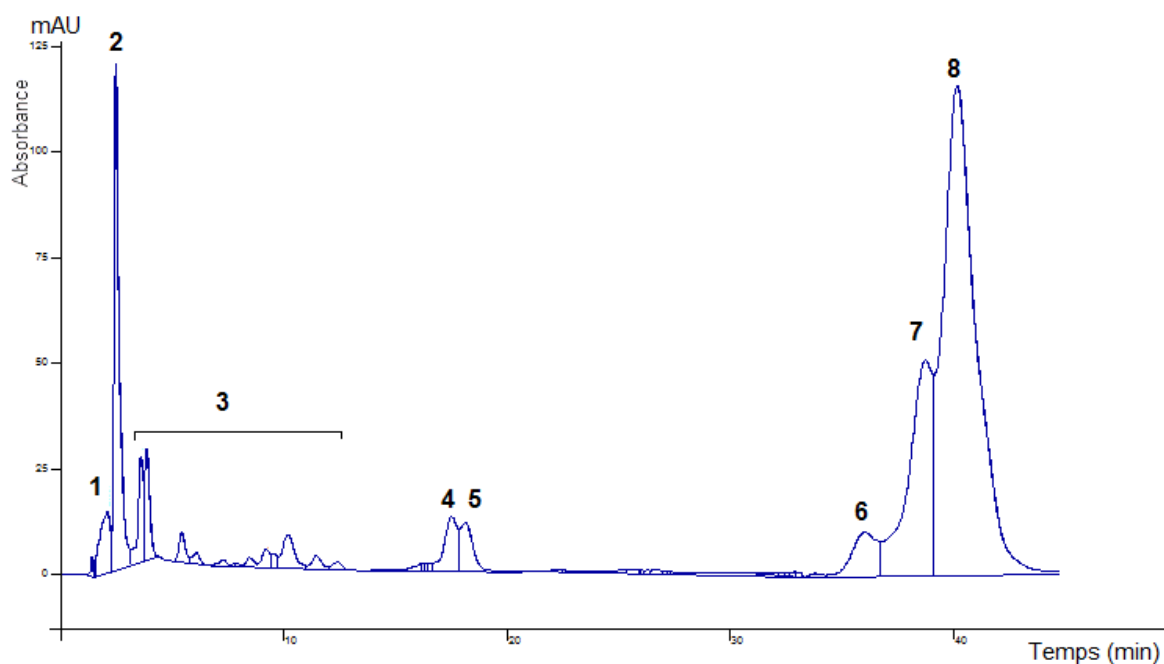


Figure 3.51: Profil du chromatogramme de l'extrait hexanique de la biomasse orange de la souche *D. salina* DunaDZ1 en utilisant la méthode d'extraction par liquides pressurisés à 90°C, pendant 15 min.

pic 1: violaxanthine; **pic 2:** lutéine; **pics 3:** pigments chlorophylliens et phéophytines; **pics 4 et 5:** pigments caroténoïdes non identifiés; **pic 6:** α -carotène; **pic 7:** *cis*, β -carotène; **pic 8:** *trans*, β -carotène.

Conditions: colonne Eclipse XDB C18 (150 \times 4,6 mm; granulométrie 5 μ m); phase mobile, méthanol à 100%, temps 50 min; débit 1,5 mL/min; longueur de détection 450 nm.

La reconnaissance des pics a été faite par les spectres UV-visible.

Tableau 3.18: Composition en pigments caroténoïdes des extraits obtenus par PLE à partir de la biomasse orange de la souche de *D. salina* DunaDZ1. Les résultats sont exprimés en milligramme par gramme (mg/g) d'extrait sec.

Pigment Extrait	Violaxanthine	Lutéine	PNI* n°1	PNI* n°2	α-carotène	Cis,β-carotène	Trans,β-carotène
Ethanol 90°C	39,73	58,34	43,32	40,63	41,33	68,12	177,58
Ethanol 120°C	38,45	51,31	39,86	36,99	41,25	147,49	105,43
Ethanol 150°C	39,45	42,71	36,62	38,00	38,13	72,81	66,47
<i>n</i> -Hexane 90°C	47,90	87,16	49,74	47,74	57,04	138,54	357,10
<i>n</i> -Hexane 120°C	45,00	102,32	51,21	44,57	49,90	127,78	234,85
<i>n</i> -Hexane 150°C	43,62	51,98	39,81	37,56	38,32	49,72	51,90
<i>n</i> -Hexane:éthanol 90°C	42,50	81,14	43,51	39,75	47,90	107,64	295,23
<i>n</i> -Hexane:éthanol 120°C	37,95	53,50	39,09	37,08	43,27	102,77	141,95
<i>n</i> -Hexane:éthanol 150°C	37,86	69,37	43,35	36,55	36,83	38,94	43,05
Acétate d'éthyle 90°C	47,10	101,70	47,66	43,99	50,75	92,57	289,74
Acétate d'éthyle 120°C	45,43	95,47	43,96	43,62	51,26	77,81	254,37
Acétate d'éthyle 150°C	42,18	78,00	41,14	40,63	45,03	74,22	170,79

*PNI n°1 et PNI n°2: pigments caroténoïdes non identifiés.

VII.1.5. Activité antioxydante

Les extraits obtenus par les méthodes d'extraction UAE et PLE à partir de la souche *D. salina* DunaDZ1 ont été analysés pour évaluer leur pouvoir antioxydant. Les résultats sont exprimés en IC₅₀. Les extraits ayant une forte activité antioxydante sont ceux possédant une faible valeur de l'IC₅₀.

Les résultats montrent que la biomasse orange a une activité antioxydante intéressante comparativement à la biomasse verte (tableau 3.19). L'extrait obtenu par l'acétate d'éthyle possède l'activité antioxydante la plus élevée qui se manifeste par l'IC₅₀ la plus faible et cela pour les deux méthodes testées (UAE et PLE) et les deux biomasses (verte et orange).

Pour la méthode d'extraction par UAE à partir de la biomasse orange, l'activité antioxydante la plus forte est révélée dans l'extrait obtenu par l'acétate d'éthyle (IC₅₀ = 250,49 ± 0,32 µg/mL), tandis que la plus faible activité antioxydante est enregistrée pour l'extrait isobutanolique (IC₅₀ = 480,53 ± 0,23 µg/mL). En revanche, pour la biomasse verte des valeurs supérieures ont été trouvées, la plus faible d'entre elles étant enregistrée dans l'extrait à l'acétate d'éthyle (IC₅₀ = 451,29 ± 0,18 µg/mL) et la plus élevée dans l'extrait au *n*-hexane:éthanol (3:4) (IC₅₀ = 630,60 ± 0,38 µg/mL).

Tableau 3.19: Activité antioxydante des extraits obtenus par UAE à partir des biomasses verte et orange de la souche *D. salina* DunaDZ1.

Solvants	Température (°C)	IC ₅₀ * (µg/mL)	
		Biomasse verte	Biomasse orange
<i>n</i> -Hexane:éthanol (3:4)	50	630,60 ± 0,38	316,30 ± 0,26
Acétate d'éthyle	50	451,29 ± 0,18	250,49 ± 0,32
Isopropanol	50	533,86 ± 0,20	432,33 ± 0,62
Acétone	50	551,27 ± 0,31	299,31 ± 0,43
Isobutanol	50	605,80 ± 0,52	480,53 ± 0,23

*IC₅₀: c'est la concentration de l'extrait nécessaire pour piéger 50 % de radicaux libres (DPPH) (calculée par régression linéaire des pourcentages d'inhibition obtenus en fonction des différentes concentrations des extraits).

Les valeurs sont la moyenne de trois répétitions ± l'écart-type.

Pour la méthode d'extraction par PLE, nous constatons que la température a un effet sur l'activité antioxydante de tous les extraits. La température d'extraction qui a abouti à des IC_{50} les plus faibles (donc activités antioxydantes les plus fortes) est de 120°C, tandis qu'à une température de 150°C les IC_{50} sont plus fortes. Tout comme l'extraction par UAE c'est aussi l'extrait à l'acétate d'éthyle qui a enregistré la plus faible IC_{50} , qui est de $193,91 \pm 0,22 \mu\text{g/mL}$ et $336,18 \pm 0,59 \mu\text{g/mL}$, pour la biomasse orange et verte, respectivement (tableau 3.20). L'activité antioxydante des extraits obtenus à partir de la biomasse orange à une température de 90°C est la plus faible, tandis que pour la biomasse verte les effets antioxydants les plus faibles sont enregistrés à une température d'extraction de 150°C.

Tableau 3.20: Activité antioxydante des extraits obtenus par PLE à partir des biomasses verte et orange de la souche *D. salina* DunaDZ1.

Solvants	Température (°C)	IC_{50}^* ($\mu\text{g/mL}$)	
		Biomasse verte	Biomasse orange
Ethanol	90	$674,73 \pm 0,28$	$568,57 \pm 0,48$
	120	$604,82 \pm 0,34$	$456,51 \pm 0,22$
	150	$692,21 \pm 0,38$	$545,45 \pm 0,32$
<i>n</i> -Hexane	90	$758,49 \pm 0,13$	$496,77 \pm 0,25$
	120	$650,37 \pm 0,26$	$359,06 \pm 0,32$
	150	$774,85 \pm 0,44$	$423,81 \pm 0,21$
<i>n</i> -Hexane:éthanol (3:4)	90	$605,71 \pm 0,52$	$494,36 \pm 0,35$
	120	$522,85 \pm 0,60$	$371,08 \pm 0,24$
	150	$707,60 \pm 0,49$	$401,86 \pm 0,32$
Acétate d'éthyle	90	$427,37 \pm 0,38$	$279,22 \pm 0,63$
	120	$336,18 \pm 0,59$	$193,91 \pm 0,22$
	150	$446,72 \pm 0,41$	$344,29 \pm 0,33$

* IC_{50} : c'est la concentration de l'extrait nécessaire pour piéger 50% de radicaux libres (DPPH) (calculée par régression linéaire des pourcentages d'inhibition obtenus en fonction des différentes concentrations des extraits).

Les valeurs sont la moyenne de trois répétitions \pm l'écart-type.

VII.2. Discussion

Le recours à des méthodes d'extraction des pigments caroténoïdes plus efficaces en termes de rendement, de temps, de simplicité et de coût, mais aussi qui limitent la consommation de solvants, devient une priorité [194].

Les solvants organiques sont communément utilisés pour extraire les molécules bioactives à partir de différentes ressources naturelles (plantes, micro-algues, macroalgues, bactéries, etc.) [225]. Ces solvants ne doivent présenter aucun danger pour l'environnement et le consommateur, notamment dans le cas où le produit fini est destiné à l'industrie alimentaire ou au marché des cosmétiques [194, 226].

Comparativement aux méthodes d'extraction conventionnelles, la méthode d'extraction par liquides pressurisés est plus rapide et utilise moins de solvant, tout en améliorant le rendement de l'extraction [226].

La température d'extraction est parmi les paramètres qui doivent être pris en considération lors de l'extraction par la technique PLE. Plusieurs travaux ont montré que la pression n'a pas une influence significative sur la qualité et la quantité de l'extrait obtenu. Elle doit être maintenue la plus haute possible afin de garder le solvant dans son état liquide [227, 228, 229, 230].

La méthode PLE a déjà été utilisée par plusieurs auteurs pour l'extraction des pigments caroténoïdes à partir de *Dunaliella salina* [86], *Chlorella ellipsoidea* [231] et *Neochloris oleoabundans* [230].

La méthode UAE est aussi une bonne méthode d'extraction comparativement aux méthodes conventionnelles. Elle a déjà été utilisée pour extraire certains pigments, tels que les pigments caroténoïdes à partir de *D. salina* [147] et la phycobiliprotéine à partir de la cyanobactérie *Spirulina platensis*.

C'est dans ce contexte que nous avons évalué ces deux techniques pour l'extraction des pigments caroténoïdes à partir de la souche *D. salina* DunaDZ1: UAE à 50°C pendant 30 min, et PLE à 90, 120 et 150°C pendant 15 min et une pression de 1600 PSI.

Nous avons obtenu des rendements nettement supérieurs (trois fois plus) dans les extraits par PLE comparativement à l'UAE. L'extraction à partir de la biomasse verte a donné des rendements supérieurs à ceux obtenus à partir de la biomasse orange. De meilleurs rendements ont été enregistrés pour la méthode PLE à une température de 150°C et avec le solvant le plus polaire (parmi ceux utilisés) qui est l'éthanol, et ce, pour les biomasses verte et orange. La polarité du solvant et la température de l'extraction sont des facteurs qui jouent un rôle primordial dans l'amélioration des rendements de l'extraction. De ce point de vue, la méthode par PLE est donc bien meilleure que la méthode par UAE, comme l'ont déjà souligné Saini et Keum [18].

Pour évaluer l'efficacité de la méthode d'extraction et des solvants employés, une caractérisation a été effectuée par des méthodes chromatographiques (CCM et HPLC-DAD).

L'analyse par CCM montre que pour les deux techniques d'extraction employées, les pigments majoritaires sont les pigments chlorophylliens pour la biomasse verte et le β -carotène pour la biomasse orange. En plus de ces pigments, nous avons constaté la présence, pour les deux méthodes d'extraction, de spots grisâtres caractéristiques des phéophytines qui sont des produits de dégradation de la chlorophylle [232]. Le *n*-hexane, l'acétate d'éthyle et l'acétone sont les solvants qui ont engendré la formation des spots les plus intenses de phéophytines, leur intensité étant également fonction de la température. La phéophytine est une molécule de chlorophylle qui a perdu son ion de magnésium (Mg^{2+}). Une haute température et/ou un pH acide accélère la dégradation de la chlorophylle et par conséquent la formation de grandes quantités de phéophytines [233]. Des remarques similaires ont été signalées par Jaime *et al.* [232] qui ont constaté que le *n*-hexane provoque la formation de phéophytines plus que l'éthanol. Cette constatation a été également faite sur des extraits obtenus par PLE à partir de la micro-algue *Haematococcus pluvialis* [232].

La caractérisation par HPLC-DAD a montré la présence de différents pigments caroténoïdes dont la concentration varie en fonction de la technique d'extraction, du solvant et de la température d'extraction. Les techniques PLE et UAE extraient le β -

carotène comme étant le pigment majoritaire dans la biomasse orange de *D. salina* DunaDZ1, mais avec de meilleures quantités pour la technique PLE.

L'ordre de la concentration des pigments caroténoïdes dans la biomasse verte (pour les deux techniques d'extraction) est le suivant: la lutéine > la violaxanthine > l' α -carotène > le β -carotène. Cependant, pour la biomasse orange, l'ordre est le suivant: le *trans*, β -carotène > le *cis*, β -carotène > la lutéine > l' α -carotène > la violaxanthine. Des résultats similaires ont été obtenus sur *D. salina* par Hu *et al.* [128], Ben-Amotz *et al.* [8], Prieto *et al.* [124] et Fu *et al.* [12].

Nous constatons que la technique d'extraction par PLE a donnée des quantités trois fois plus élevées en β -carotène (dans la biomasse orange) en comparaison avec la technique UAE.

Du point de vue solvant d'extraction, l'acétate d'éthyle est celui qui a donné de meilleures quantités en pigments caroténoïdes, en employant la technique UAE. En revanche, pour la technique PLE, c'est le *n*-hexane à une température d'extraction de 90°C qui était le meilleur solvant. Ceci s'explique principalement par la différence de polarité des solvants utilisés. Les pigments caroténoïdes apolaires (ex., le β -carotène) sont plus solubles dans le *n*-hexane (solvant apolaire) et l'acétate d'éthyle (moyennement polaire) [234], tandis que les pigments caroténoïdes polaires (ex., la lutéine) montrent une meilleure solubilité dans l'éthanol et l'acétone [235].

L'emploi de trop hautes températures (ex., 150°C) pour l'extraction des pigments caroténoïdes par PLE est déconseillé car nous avons remarqué que plus la température augmente et plus les teneurs en pigments caroténoïdes diminuent. Cette diminution est due à la dégradation de ces derniers vu qu'ils sont des composés relativement thermolabiles.

Cependant, nous avons signalé auparavant que le rendement de l'extraction augmente avec la température, tandis que la quantité des pigments caroténoïdes diminue. Cette amélioration du rendement en fonction de la température est due à l'extraction de composés autres que les pigments caroténoïdes, comme par exemple les lipides.

Lin *et al.* [236] ont étudié par HPLC les pigments caroténoïdes de *D. salina*. Ils ont trouvé que la biomasse orange est composée de 474,82 mg/g de *trans*, β -carotène, 425,64 mg/g de *cis*, β -carotène, 22,77 mg/g de lutéine, 39,26 mg/g de zéaxanthine et 9,26 mg/g d' α -carotène, en utilisant le mélange de solvants *n*-hexane:acétone:éthanol (2:1:1) et en employant une méthode d'extraction conventionnelle. En revanche, dans une autre étude sur *D. salina* des valeurs largement inférieures ont été enregistrées par Herrero *et al.* [237] en utilisant la méthode PLE à des températures de 40, 100 et 160°C par le *n*-hexane. Les teneurs, pour la biomasse orange, oscillent de 2,57 à 227,7 mg/g pour le *trans*, β -carotène, de 4,23 à 22,92 pour le *cis*, β -carotène et de 0,78 à 24,77 mg/g d' α -carotène. Cette différence entre la composition en pigments caroténoïdes des souches de *D. salina* peut être expliquée par le fait que l'accumulation des pigments caroténoïdes dans cette micro-algue est largement dépendante des conditions de culture. La salinité, l'intensité lumineuse, la concentration en nitrate dans le milieu et la photopériode sont des facteurs déterminants de la composition de la biomasse [51, 109]. Ceci fait que la comparaison de nos résultats avec ceux obtenus par d'autres auteurs est très difficile, voire impossible.

En plus de la production de quantités importantes en β -carotène, *D. salina* DunaDZ1 peut aussi être considérée comme une souche productrice de lutéine et de zéaxanthine. La lutéine et la zéaxanthine sont deux xanthophylles qui peuvent aider à la prévention contre les maladies dégénératives chez l'Homme, comme par exemple la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) qui se traduit par une perte progressive de la vision centrale [238].

L'activité antioxydante a aussi été évaluée pour les extraits obtenus par les techniques d'extraction UAE et PLE à partir des biomasses verte et orange de *D. salina* DunaDZ1. La plus forte activité antioxydante a été enregistrée pour la biomasse orange comparativement à la biomasse verte. Ceci peut être expliqué par la richesse de la biomasse orange par différents pigments caroténoïdes, notamment le β -carotène. Ces pigments sont connus dans la littérature comme étant des composés doués d'un fort pouvoir antioxydant [18, 239].

Une meilleure activité antioxydante de la biomasse orange a été enregistrée pour l'extrait à l'acétate d'éthyle en utilisant la méthode PLE à 120°C. Les pigments

caroténoïdes sont responsables en grande partie de l'activité antioxydante chez *D. salina*, mais d'autres molécules comme les composés phénoliques, les acides gras polyinsaturés et les polysaccharides peuvent également être présents et contribuent à l'augmentation de l'activité antioxydante [240, 241]. Cette différence entre l'activité antioxydante obtenue par différents solvants s'explique par la différence de polarité des composés antioxydants contenus dans la biomasse de *D. salina*.

Dans une étude menée sur l'activité antioxydante de différentes micro-algues marocaines, une meilleure activité ($IC_{50} = 283 \mu\text{g/mL}$) a été enregistrée chez une souche de *Dunaliella* sp. [78]. En revanche, Cakmak *et al.* [242] ont enregistré des IC_{50} variant de 450 à 3460 $\mu\text{g/mL}$ pour des extraits par différents solvants à partir d'une souche de *D. salina* (nous rappelons que plus l' IC_{50} est grande et plus l'activité antioxydante est faible).

Hu *et al.* [128] ont démontré que l'activité antioxydante des pigments caroténoïdes extraits à partir d'une souche de *D. salina* est supérieure à l'activité antioxydante des pigments caroténoïdes de synthèse, ce qui ouvre de nombreuses voies de valorisation de ces composés.

VIII. ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES EXTRAITS DE LA BIOMASSE DE *D. salina* DUNADZ1

VIII.1. Résultats

Des extractions par différents solvants à partir des phases verte et orange de *D. salina* DunaDZ1 ont été effectuées. Ces extraits ont été testés pour leurs activités antimicrobiennes sur milieu solide par la méthode de diffusion des disques. Ce test a été réalisé contre dix germes dont neuf sont pathogènes, parmi lesquels des bactéries (trois à Gram positif et trois à Gram négatif), une levure et trois champignons filamenteux. Le tableau 3.21 et la figure 3.52 résumant les résultats.

Tous les extraits de la biomasse verte ont présenté une activité contre au moins un germe-cible, sauf l'extrait aqueux qui s'est révélé totalement inactif. En revanche, il n'y a que l'extrait éthanolique qui a présenté une activité vis-à-vis des bactéries à Gram négatif. L'éthanol s'est révélé être le meilleur solvant d'extraction. C'est un solvant moyennement polaire (indice de polarité = 4,3). De ce fait nous pouvons dire que la biomasse verte de *D. salina* DunaDZ1 contient des composés bioactifs moyennement polaires et possédant une activité antimicrobienne.

Tous les microorganismes sont inhibés à l'exception de *Candida albicans* M3. Les résultats indiquent que le microorganisme le plus sensible est *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 avec un diamètre d'inhibition de 20 mm pour l'extrait éthanolique. Ce résultat est intéressant car *L. monocytogenes* est une bactérie très dangereuse pour l'Homme et responsable d'intoxications alimentaires pouvant être mortelles en raison de la sécrétion de diverses toxines [243]. Par ailleurs, une activité moindre (10 à 13 mm) de l'extrait éthanolique a été observée contre les autres microorganismes. Parmi ces derniers, les plus résistants sont *Salmonella enterica* serovar Typhi ATCC 14028 et *Fusarium culmorum* FC1.

En revanche, aucune activité antimicrobienne n'a été détectée dans les extraits de la phase orange et cela pour les quatre solvants utilisés.

Tableau 3.21: Activité antimicrobienne de la biomasse verte de *D. salina* sur milieu solide.

Souche Extrait	Zone d'inhibition (Zi en mm)									
	Bactéries à Gram positif			Bactéries à Gram négatif			Levure	Champignons filamenteux		
	Sa 639c	LM	BS	<i>E. coli</i>	Pa	SE	<i>C. albicans</i>	AC	FC	UR
Aqueux	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Méthanolique	-	11	8	-	-	-	-	-	-	8
Ethanolique	12	20	13	12	12	10	-	11	10	12
Chloroformique	-	13	8	-	-	-	-	-	-	10

Sa 639c: *Staphylococcus aureus* 639c; **LM:** *Listeria monocytogenes* ATCC 13932; **BS:** *Bacillus subtilis* ATCC 6633; **E. coli:** *Escherichia coli* E52; **Pa:** *Pseudomonas aeruginosa* IPA1; **SE:** *Salmonella enterica* serovar Typhi ATCC 14028; **C. albicans:** *Candida albicans* M3; **AC:** *Aspergillus carbonarius* M333; **FC:** *Fusarium culmorum* FC1; **UR:** *Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829.

Le diamètre du disque de papier (6 mm) est compris dans les mesures de la Zone d'inhibition.

Remarque: les extraits de la biomasse orange par les quatre solvants n'ont montré aucune activité contre tous les microorganismes testés.

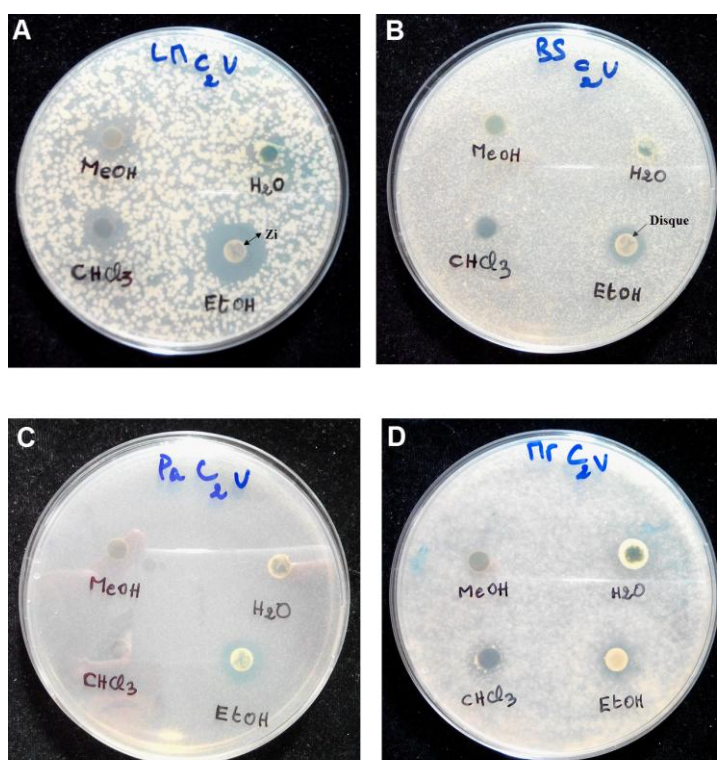


Figure 3.52: Activité antimicrobienne des extraits de la biomasse verte de la souche DunaDZ1 contre: **(A)** *L. monocytogenes* ATCC 13932, **(B)** *B. subtilis* ATCC 6633, **(C)** *P. aeruginosa* IPA1 et **(D)** *Umbelopsis ramanniana* NRRL 1829 (photographie originale).

H₂O: extrait aqueux; **MeOH:** extrait méthanolique; **EtOH:** extrait éthanolique; **CHCl₃:** extrait chloroformique

VIII.2. Discussion

Dans la littérature, il existe peu de travaux sur l'étude du potentiel antimicrobien de *Dunaliella salina*. Herrero *et al.* [86] ont montré une bonne activité des extraits d'une souche de *D. salina* contre *Escherichia coli* ATCC 11775 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en utilisant la méthode d'extraction PLE et en employant des solvants à faible polarité (le *n*-hexane et l'éther de pétrole). Mendiola *et al.* [87] ont effectué des extractions à partir de la biomasse sèche d'une autre souche de *D. salina* en utilisant la méthode d'extraction au CO₂ supercritique. Les résultats ont montré que leur extrait est actif contre *Escherichia coli* ATCC 11775, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Candida albicans* ATCC 60193. Ces extraits ont une très faible activité contre le champignon *Aspergillus niger* ATCC 16404. D'après Cakmak *et al.* [244], les extraits éthanolique et méthanolique d'une souche de *D. salina* ont des activités meilleures que ceux du dichlorométhane et du *n*-hexane. Les activités sont dirigées contre des bactéries à Gram positif et à Gram négatif et contre *Candida albicans* ATCC 10231 (les champignons filamenteux n'ayant pas été testés). Dans d'autres études menées sur différents genres de micro-algues, l'activité antimicrobienne était meilleure dans les extraits obtenus avec l'acétone [245, 246], le benzène ou encore l'acétate d'éthyle [92].

Les molécules antimicrobiennes des micro-algues ne sont pas hydrophiles, ce qui justifie que dans les extraits aqueux, cette activité est rarement détectée [245].

En comparant nos résultats avec ceux obtenus par d'autres auteurs, nous pouvons conclure que l'extraction de molécules antimicrobiennes est fortement dépendante des germes-cibles (espèces et souches), de la polarité du solvant et de la méthode d'extraction. La production de molécules bioactives est aussi dépendante du genre de la micro-algue étudiée, de l'espèce, de la souche et même des conditions de culture pour une même souche [247].

Les molécules antimicrobiennes présentes dans les extraits organiques des micro-algues ont été caractérisées par certains auteurs. Ces molécules bioactives peuvent être des pigments, comme la phycolipoprotéine et les dérivés de la chlorophylle *a* et *b*, ou des acides gras libres [94, 248]. Rodríguez-Meizoso *et al.* [90]

ont trouvé que l'activité antimicrobienne est élevée dans les extraits riches en acide butanoïque et en méthyl ester 2-hydroxypropanoïque (lactate de méthyle). L'activité antimicrobienne des extraits à partir des micro-algues est aussi attribuée à d'autres composés appartenant à plusieurs classes chimiques telles que les indoles, les terpènes, les acétogénines, les phénols et les hydrocarbures halogénés volatils [249, 250].

Cependant, l'activité antimicrobienne détectée dans plusieurs extraits de *Dunaliella salina* est due non seulement à certains acides gras, mais aussi à d'autres composés tels que l' α -ionone, le β -ionone, le β -cyclocitral, le néophytadiène et le phytol [86].

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Au vu de leur biodiversité et de leurs propriétés biochimiques, les micro-algues se révèlent très prometteuses pour de nombreuses applications dans des domaines variés tels que l'industrie pharmaceutique, l'agro-alimentaire, l'environnement et les énergies renouvelables. La micro-algue *Dunaliella salina* est parmi les micro-algues qui possèdent une grande capacité à produire, dans certaines conditions, des quantités importantes en β -carotène. Les pigments caroténoïdes, notamment le β -carotène, sont de plus en plus recherchés et employés dans l'industrie alimentaire comme colorants naturels, suite aux restrictions imposées par la réglementation mondiale limitant l'utilisation des colorants artificiels. D'autres pigments caroténoïdes synthétisés par *Dunaliella salina*, tels que l'astaxanthine, la lutéine, la zéaxanthine et la canthaxanthine sont des antioxydants utilisés en alimentation humaine et animale, et aussi en aquaculture.

Les travaux réalisés lors de cette thèse ont ciblé l'étude de la micro-algue du genre *Dunaliella*, notamment les souches appartenant à l'espèce *Dunaliella salina*. Cette étude a englobé une caractérisation taxonomique de plusieurs souches et une étude de la caroténogénèse chez *D. salina* DunaDZ1, ainsi que les techniques d'extraction des pigments caroténoïdes à partir de cette souche.

L'isolement à partir des eaux des sebkhas étudiées a permis de collecter 26 souches, dont 24 appartiennent au genre *Dunaliella* et 2 à d'autres genres. Les souches ont été classées en 5 groupes, et une souche représentative de chaque groupe a été retenue pour l'analyse morphologique.

Une étude phylogénétique a été menée sur les 5 souches représentatives de chaque groupe, en amplifiant la région ITS et les gènes *rbcL* et *18S*. Pour le reste des souches, la région ITS a été retenue. Parmi les 26 souches, 17 sont rattachées à l'espèce *D. salina*, 1 à *D. parva* et 6 à *D. viridis*, tandis que les deux souches restantes appartiennent au genre *Tetraselmis* et à un probable nouveau genre. Deux souches (DunaDZ1 et DunaDZ4) ont subi un test de caroténogénèse. Ce test a déterminé la poursuite des travaux sur la souche DunaDZ1 qui est productrice de pigments caroténoïdes.

La croissance de la souche *D. salina* DunaDZ1 en présence de différentes concentrations de NaCl a permis de connaître son optimum de croissance. Afin de déterminer les conditions de culture qui aboutissent à une meilleure production en pigments caroténoïdes par la souche *D. salina* DunaDZ1, différents tests ont été menés. Ces tests ont permis de retenir la méthode de culture en deux phases, ainsi que deux milieux de cultures, Johnson et f/2. Les facteurs de stress qui ont été testés sont le stress salin à 2 M de NaCl, le stress par déficience en nitrate et le stress par le cumul de ces deux facteurs. Une meilleure croissance lors de la phase verte (phase de croissance) a été enregistrée dans le milieu Johnson. Par ailleurs, une meilleure accumulation en pigments caroténoïdes lors de la phase orange (phase de stress) a été enregistrée dans le milieu f/2 en appliquant le stress salin (à 2 M de NaCl).

Une étude sur l'efficacité de deux méthodes de récoltes a permis de retenir la centrifugation comme étant la meilleure méthode de récupération de la biomasse de *D. salina* DunaDZ1. La méthode par floculation, par ajustement du pH, s'avère efficace du point de vue quantité récupérée, mais inefficace de point de vue qualité nutritionnelle de la biomasse récoltée. En effet, cette méthode affecte d'une manière très remarquable non seulement la quantité des protéines et des carbohydrates cellulaires, mais aussi le profil des acides gras.

Après avoir déterminé les conditions qui aboutissent à une meilleure production des pigments caroténoïdes, une mise à l'échelle de la culture de la souche *D. salina* DunaDZ1 a été conduite. Cette mise à l'échelle a été réalisée afin de collecter le maximum de biomasse laquelle est ensuite utilisée pour entreprendre

des études sur les différentes techniques d'extraction des pigments caroténoïdes.

L'extraction des pigments caroténoïdes à partir des biomasses (verte et orange) de *D. salina* DunaDZ1 a été effectuée par deux techniques, l'extraction assistée par ultrasons et l'extraction par liquides pressurisés. L'extraction par liquides pressurisés a montré une amélioration importante dans les rendements de l'extraction comparativement à la méthode d'extraction assistée par ultrasons. Le pigment majoritaire produit par la souche *D. salina* DunaDZ1 lors des conditions de stress salin est le β -carotène (*trans*, β -carotène suivi du *cis*, β -carotène). De meilleures

quantités en *trans*, β -carotène et en *cis*, β -carotène ont été obtenues par la technique de l'extraction par liquides pressurisés. Le meilleur solvant qui a abouti à l'obtention d'importantes teneurs en *trans* et *cis*, β -carotène est le *n*-hexane à la température testée la moins élevée (90°C). Le β -carotène est un pigment caroténoïde très recherché dans les industries agroalimentaires (comme colorant naturel et comme agent antioxydant) et dans les industries pharmaceutiques et cosmétiques.

La température d'extraction est un facteur très important et qu'il faut prendre en considération lors de l'extraction. Elle présente un effet positif sur le rendement de l'extraction, mais un effet négatif sur les quantités des pigments caroténoïdes.

L'activité antioxydante a été évaluée pour tous les extraits obtenus par les deux techniques et par les différents solvants. Une meilleure activité antioxydante a été révélée dans la biomasse orange extraite par l'acétate d'éthyle. Comme dans le cas des pigments caroténoïdes, l'activité antioxydante est aussi affectée par les hautes températures.

Différents extraits à partir des biomasses verte et orange de *D. salina* DunaDZ1 ont été testés pour leur pouvoir antimicrobien vis-à-vis de dix microorganismes dont plusieurs sont pathogènes pour l'Homme. Les résultats ont montré une activité antibactérienne et antifongique, mais uniquement pour la biomasse verte, la biomasse orange étant inactive. L'extrait éthanolique s'est révélé être le meilleur extrait actif.

De ce qui précède, nous pouvons considérer la souche étudiée, *D. salina* DunaDZ1, comme étant une souche prometteuse qui peut être orientée vers la production des pigments caroténoïdes, majoritairement le β -carotène, et notamment l'isomère *cis*, β -carotène, qui est à ce jour non produit par différentes voies de synthèse, contrairement à l'isomère *trans*, β -carotène. La souche DunaDZ1 est considérée comme une souche riche en composés doués d'une activité antioxydante.

Comme perspectives, il serait intéressant d'effectuer d'autres extractions en employant la méthode par liquides pressurisés, mais en utilisant des solvants ou des

mélange de solvants «verts» afin d'aboutir à une technique d'extraction plus respectueuse de l'environnement.

Lors de ce travail de thèse, l'intérêt a porté sur les pigments caroténoïdes et sur la capacité antioxydante des extraits d'une manière générale. Il serait très intéressant de connaître en détail l'activité antioxydante exercée par chacun des pigments contenus dans les biomasses (verte et orange) de la souche *D. salina* DunaDZ1, et de connaître aussi les autres molécules qui pourraient être responsables en partie de cette activité.

Il serait intéressant également de rechercher d'autres souches à partir des environnements très peu exploités en Algérie, qui pourraient être prometteuses pour la production de molécules à haute valeur ajoutée et applicables dans le domaine alimentaire et nutraceutique.

Enfin, dans un autre cadre, il serait intéressant de confirmer l'originalité du genre de la souche DunaDZ25 en séquençant d'autres gènes que celui qui code pour la région ITS et de tester ses potentialités biotechnologiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Lü J., Sheahan C. et Fu P. (2011). Metabolic engineering of algae for fourth generation biofuels production. *Energy and Environmental Science*, **4**: 2451-2466.
- [2] Amor H. B. (2015). Etude et optimisation de bioaccumulation de Mg²⁺ dans les microalgues «*Chlorella vulgaris*». Thèse de doctorat, option Génie des procédés, Université Paris-Saclay, France. 216 p.
- [3] 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.
- [4] 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).
- [5] Oren A. (2014). The ecology of *Dunaliella* in high-salt environments. *Journal of Biological Research*, **21**: 23.
- [6] Borowitzka M. et 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.
- [7] Zhang J., Sun Z., Sun P., Chen T. et Chen F. (2014). Microalgal carotenoids: Beneficial effects and potential in human health. *Food & function*, **5**: 413-425.
- [8] Ben-Amotz A., Polle J. r. E. W. et Subba Rao D. V. (2009). The alga *Dunaliella*: biodiversity, physiology, genomics and biotechnology. Science Publishers (Eds), Enfield, 549 p.
- [9] Pasqualetti M., Bernini R., Carletti L., Crisante F. et Tempesta S. (2010). Salinity and nitrate concentration on the growth and carotenoids accumulation in a strain of *Dunaliella salina* (*Chlorophyta*) cultivated under laboratory conditions. *Transitional Waters Bulletin*, **4**: 94-104.
- [10] Xu Y., Ibrahim I. M. et Harvey P. J. (2016). The influence of photoperiod and light intensity on the growth and photosynthesis of *Dunaliella salina* (*Chlorophyta*) CCAP 19/30. *Plant Physiology and Biochemistry*, **106**: 305-315.
- [11] Ismaiel M. M. S., El-Ayouty Y. M., Said A. A. et Fathey H. A. (2018). Transformation of *Dunaliella parva* with PSY gene: carotenoids show enhanced antioxidant activity under polyethylene glycol and calcium treatments. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **16**: 378-384.

- [12] Fu W., Guðmundsson Ó., Paglia G., Herjólfsson G., Andrésón Ó. S., Palsson B. O. et Brynjólfsson S. (2013). Enhancement of carotenoid biosynthesis in the green microalga *Dunaliella salina* with light-emitting diodes and adaptive laboratory evolution. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **97**: 2395-2403.
- [13] Barredo J. L. (2012). Microbial carotenoids from bacteria and microalgae: methods and protocols. Humana Press (Eds), New York. 355 p.
- [14] Lorenz R. T. et Cysewski G. R. (2000). Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnology*, **18**: 160-167.
- [15] Ahmed F., Fanning, K., Netzel M., Turner W., Li Y. et Schenk P. M. (2014). Profiling of carotenoids and antioxidant capacity of microalgae from subtropical coastal and brackish waters. *Food chemistry*, **165**: 300-306.
- [16] De Jesus Raposo M. F. et de Morais A. M. M. B. (2015). Microalgae for the prevention of cardiovascular disease and stroke. *Life Sciences*, **125**: 32-41.
- [17] Bogacz-Radomska L. et Harasym J. (2018). β -Carotene properties and production methods. *Food Quality and Safety*, **2**: 69-74.
- [18] Saini R. K. et Keum Y.-S. (2018). Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chemistry*, **240**: 90-103.
- [19] Dufossé L., Galaup P., Yaron A., Arad S. M., Blanc P., Murthy K. N. C. et Ravishankar G. A. (2005). Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality. *Trends in Food Science & Technology*, **16**: 389-406.
- [20] Hu J., Nagarajan D., Zhang Q., Chang J.S. et Lee D.J. (2018). Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. *Biotechnology advances*, **36**: 54-67.
- [21] Kulkarni S. et Nikolov Z. (2018). Process for selective extraction of pigments and functional proteins from *Chlorella vulgaris*. *Algal Research*, **35**: 185-193.
- [22] Tebbani S., Filali R., Dumur D., Lopes F. et Pareau D. (2014). Biofixation de CO₂ par les microalgues: Modélisation, estimation et commande. ISTE editions (Ed), London. 156 p.
- [23] Rizwan M., Mujtaba G., Memon S. A., Lee K. et Rashid N. (2018). Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **92**: 394-404.
- [24] Smetana S., Sandmann M., Rohn S., Pleissner D. et Heinz V. (2017). Autotrophic and heterotrophic microalgae and cyanobacteria cultivation for food and feed: life cycle assessment. *Bioresource Technology*, **245**: 162-170.

- [25] **Dejoye C. (2013)**. Eco-Extraction and analysis of lipid from microalgae for the production of biodiesel. Thèse de Doctorat, spécialité Chimie, Université d'Avignon, France. 176 p.
- [26] **Perez-Garcia O., Escalante F. M., de-Bashan L. E. et Bashan Y. (2011)**. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Research*, **45**: 11-36.
- [27] **Heimann K. et Huerlimann R. (2015)**. Microalgal classification: major classes and genera of commercial microalgal species. *In: Handbook of marine microalgae*. Kim S. K. Academic Press, Elsevier (Ed)., pp 25-41.
- [28] **Sialve B. et Steyer J. P. (2013)**. Les microalgues, promesses et défis. *Innovations Agronomiques*, **26**: 25-39.
- [29] **Pulz O. et Gross W. (2004)**. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **65**: 635-648.
- [30] **Obando Z. Y. C. (2015)**. Caractérisation et valorisation de microalgues tropicales. Thèse de Doctorat, option Biotechnologie, Université de Bretagne Sud. 259 p.
- [31] **Person J., Lando D. et Mathieu D. (2011)**. Livre turquoise: algues, filières du futur. Édition Adebitech (Ed)., Romainville. 182 p.
- [32] **Monaco A. et Prouzet P. (2014)**. Valorisation et économie des ressources marines. ISTE Editions (Ed). 403 p.
- [33] **Le Chevanton M. (2013)**. Interactions microalgues-bactéries en système expérimental bispécifique: effets sur la croissance de *Dunaliella* sp.. Thèse de Doctorat, option Phycologie, Université de Nantes. 198 p.
- [34] **Richmond, A. (2004)**. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Blackwell Science (Eds), Oxford, 588 p.
- [35] **Posten C. et Walter C. (2012)**. Microalgal biotechnology: integration and economy. Walter de Gruyter (Ed)., Berlin. 319 p.
- [36] **Rochatte V. (2016)**. Développement et modélisation d'un photobioréacteur solaire à dilution interne du rayonnement. Thèse de Doctorat, option Génie des Procédés, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II, France. 289 p.
- [37] **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 Elkhiafi N. (2013)**. Développement potentiel de nouvelles activités économiques associées à la biotechnologie aux Canaries et au Maroc. Daute Diseno (Ed), Spain. 71 p.
- [38] **Pulz O. (2001)**. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **57**: 287-293.

- [39] Brennan L. et Owende P. (2010). Biofuels from microalgae: a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14**: 557-577.
- [40] Khadim S. R., Singh P., Singh A. K., Tiwari A., Mohanta A. et Asthana R. K. (2018). Mass cultivation of *Dunaliella salina* in a flat plate photobioreactor and its effective harvesting. *Bioresource Technology*, **270**: 20-29.
- [41] Matula E. E. et Nabity J. A. (2019). Failure modes, causes, and effects of algal photobioreactors used to control a spacecraft environment. *Life Sciences in Space Research*, **20**: 35-52.
- [42] Sierra E., Ación F., Fernández J., García J., González C. et Molina E. (2008). Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae. *Chemical Engineering Journal*, **138**: 136-147.
- [43] 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*, **144**: 1-10.
- [44] Koller M. (2015). Design of closed photobioreactors for algal cultivation. In: algal biorefineries. Prokop A., Bajpai R., Zappi M. Springer (Ed)., pp 133-186.
- [45] Le Chevanton M., Garnier M., Bougaran G., Schreiber N., Lukomska E., Bérard J.-B., Fouilland E., Bernard O. et Cadoret J. P. (2013). Screening and selection of growth-promoting bacteria for *Dunaliella* cultures. *Algal Research*, **2**: 212-222.
- [46] Vian M. A., Tanzi C. D. et Chemat F. (2013). Techniques conventionnelles et innovantes, et solvants alternatifs pour l'extraction des lipides de microorganismes. *Oilseeds and Fats, Crops and Lipids*, **20**: D607.
- [47] Harrison P. J. et Berges J. A. (2005). Marine culture media. In: algal culturing techniques. Andersen, R. A. Elsevier academic press (Ed), New York. 21-34 pp.
- [48] Croft S. L., Sundar S. et Fairlamb A. H. (2006). Drug resistance in leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, **19**: 111-126.
- [49] Fields M. W., Hise A., Lohman E. J., Bell T., Gardner R. D., Corredor L., Moll K., Peyton B. M., Characklis G. W. et Gerlach R. (2014). Sources and resources: importance of nutrients, resource allocation, and ecology in microalgal cultivation for lipid accumulation. *Microbiology and Biotechnology*, **98**: 4805-4816.
- [50] Sharma K. K., Schuhmann H. et Schenk P. M. (2012). High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies*, **5**: 1532-1553.

- [51] Karpagam R., Raj K. J., Ashokkumar B. et Varalakshmi P. (2015). Characterization and fatty acid profiling in two fresh water microalgae for biodiesel production: Lipid enhancement methods and media optimization using response surface methodology. *Bioresource Technology*, **188**: 177-184.
- [52] Pahl S. L., Lee A. K., Kalaitzidis T., Ashman P. J., Sathe S. et Lewis D. M. (2013). Harvesting, thickening and dewatering microalgae biomass. *Algae for biofuels and energy*, **5**: 165-185.
- [53] Mata T. M., Martins A. A. et Caetano N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14**: 217-232.
- [54] Muylaert K., Bastiaens L., Vandamme D. et Gouveia L. (2017). Harvesting of microalgae: Overview of process options and their strengths and drawbacks. In: *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts*. Gonzalez-Fernandez C. et Muñoz R., Woodhead Publishing (Ed)., pp 113-132.
- [55] Singh G. et Patidar S. (2018). Microalgae harvesting techniques: A review. *Journal of Environmental Management*, **217**: 499-508.
- [56] Uduman N., Qi Y., Danquah M. K., Forde G. M. et Hoadley A. (2010). Dewatering of microalgal cultures: a major bottleneck to algae-based fuels. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, **2**: 012701.
- [57] Rawat, I., Kumar R. R., Mutanda T. et Bux F. (2011). Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied energy*, **88**: 3411-3424.
- [58] Ummalyma S. B., Mathew A. K., Pandey A. et Sukumaran R. K. (2016). Harvesting of microalgal biomass: Efficient method for flocculation through pH modulation. *Bioresource Technology*, **213**: 216-221.
- [59] Liu J., Zhu Y., Tao Y., Zhang Y., Li A., Li T., Sang M. et Zhang C. (2013). Freshwater microalgae harvested via flocculation induced by pH decrease. *Biotechnology for biofuels*, **6**: 98-98.
- [60] Baya D., Effebi K., Tangou T., Keffala C. et Vassel J. (2013). Effect of hydroxyapatite, octacalcium phosphate and calcium phosphate on the auto-flocculation of the microalgae in a high-rate algal pond. *Environmental Technology*, **34**: 2407-2414.
- [61] Baya D. T., Tangou T. T., Effebi K. R., Zouhir F. et Vassel J. L. (2014). Caractérisation des phénomènes d'auto-floculation, de bio-floculation et de co-floculation des microalgues dans un chenal algal à haut rendement (synthèse bibliographique). *Agronomie, Société et Environnement*, **18**: 75-82.

- [62] Vandamme D., Foubert I., Fraeye I., Meesschaert B. et Muylaert K. (2012). Flocculation of *Chlorella vulgaris* induced by high pH: role of magnesium and calcium and practical implications. *Bioresource Technology*, **105**: 114-119.
- [63] Salim S., Bosma R., Vermuë M. H. et Wijffels R. H. (2011). Harvesting of microalgae by bio-flocculation. *Journal of Applied Phycology*, **23**: 849-855.
- [64] Bhaskar P. et Bhosle N. B. (2005). Microbial extracellular polymeric substances in marine biogeochemical processes. *Current Science*, **88**: 45-53.
- [65] Barros A. I., Gonçalves A. L., Simões M. et Pires J. C. (2015). Harvesting techniques applied to microalgae: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **41**: 1489-1500.
- [66] Heasman M., Diemar J., O'connor W., Sushames T. et Foulkes L. (2000). Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve molluscs-a summary. *Aquaculture Research*, **31**: 637-659.
- [67] Chen H. et Jiang J. G. (2009). Osmotic responses of *Dunaliella* to the changes of salinity. *Journal of Cellular Physiology*, **219**: 251-258.
- [68] Kim S. G., Choi A., Ahn C. Y., Park C. S., Park Y. H. et Oh H. M. (2005). Harvesting of *Spirulina platensis* by cellular flotation and growth stage determination. *Letters in Applied Microbiology*, **40**: 190-194.
- [69] Besson A. et Guiraud P. (2013). High-pH-induced flocculation-flotation of the hypersaline microalga *Dunaliella salina*. *Bioresource Technology*, **147**: 464-470.
- [70] Odjadjare E. C., Mutanda T. et Olaniran A. O. (2017). Potential biotechnological application of microalgae: a critical review. *Critical Reviews in Biotechnology*, **37**: 37-52.
- [71] Becker W. (2004). Microalgae in human and animal nutrition. *In*: Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Richmond A. Wiley Online Library (Eds). pp 312-351.
- [72] Liang S., Liu X., Chen F. et Chen Z. (2004). Current microalgal health food R et D activities in China. *Hydrobiologia*. **512**: 45-48.
- [73] Gheysen L., Bernaerts T., Bruneel C., Goiris K., Van Durme J., Van Loey A., De Cooman L. et Foubert I. (2018). Impact of processing on n-3 LC-PUFA in model systems enriched with microalgae. *Food Chemistry*, **268**: 441-450.
- [74] Priyadarshani I. et Rath B. (2012). Commercial and industrial applications of micro algae- A review. *Journal of Algal Biomass Utilization*, **3**: 89-100.

- [75] Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E. et Isambert A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*, **101**: 87-96.
- [76] Chew K. W., Yap J. Y., Show P. L., Suan N. H., Juan J. C., Ling T. C., Lee D. J. et Chang J. S. (2017). Microalgae biorefinery: high value products perspectives. *Bioresource Technology*, **229**: 53-62.
- [77] Moreno-Garcia L., Adjallé K., Barnabé S. et Raghavan G. (2017). Microalgae biomass production for a biorefinery system: recent advances and the way towards sustainability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **76**: 493-506.
- [78] Maadane A., Merghoub N., Ainane T., El Arroussi H., Benhima R., Amzazi S., Bakri Y. et Wahby I. (2015). Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: Pufa profiles, carotenoids and phenolic content. *Journal of Biotechnology*, **215**: 13-19.
- [79] Deng R. et Chow T. J. (2010). Hypolipidemic, antioxidant, and antiinflammatory activities of microalgae *Spirulina*. *Cardiovascular Therapeutics*, **28**: 33-45.
- [80] Zhao C., Wu Y., Yang C., Liu B. et Huang Y. (2015). Hypotensive, hypoglycaemic and hypolipidaemic effects of bioactive compounds from microalgae and marine microorganisms. *International Journal of Food Science & Technology*, **50**: 1705-1717.
- [81] Tarento T. D. C., McClure D. D., Vasiljevski E., Schindeler A., Dehghani F. et Kavanagh J. M. (2018). Microalgae as a source of vitamin K1. *Algal Research*, **36**: 77-87.
- [82] Sztrum A. A., Sabatini S. E. et Rodríguez M. C. (2012). Isocitrate lyase activity and antioxidant responses in copper-stressed cultures of *Chlamydomonas reinhardtii* (Volvocales, Chlorophyceae). *Phycologia*, **51**: 135-143.
- [83] Mayer A. M. et Hamann M. T. (2004). Marine pharmacology in 2000: marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune, and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Marine Biotechnology*, **6**: 37-52.
- [84] He H.Z., Li H.B. et Chen F. (2005). Determination of vitamin B1 in seawater and microalgal fermentation media by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **383**: 875-879.
- [85] Pane G., Cacciola G., Giacco E., Mariottini G. et Coppo E. (2015). Assessment of the antimicrobial activity of algae extracts on bacteria responsible of external otitis. *Marine Drugs*, **13**: 6440-6452.

- [86] **Herrero M., Ibáñez E., Cifuentes A., Reglero G. et Santoyo S. (2006).** *Dunaliella salina* microalga pressurized liquid extracts as potential antimicrobials. *Journal of Food Protection*, **69**: 2471-2477.
- [87] **Mendiola J. A., Santoyo S., Cifuentes A., Reglero G., Ibanez E. et Señoráns F. J. (2008).** Antimicrobial activity of sub-and supercritical CO₂ extracts of the green alga *Dunaliella salina*. *Journal of Food Protection*, **71**: 2138-2143.
- [88] **Desbois A. P., Mearns-Spragg A. et Smith V. J. (2009).** A fatty acid from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* is antibacterial against diverse bacteria including multi-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Marine Biotechnology*, **11**: 45-52.
- [89] **Smith V. J., Desbois A. P. et Dyrinda E. A. (2010).** Conventional and unconventional antimicrobials from fish, marine invertebrates and micro-algae. *Marine Drugs*, **8**: 1213-1262.
- [90] **Rodríguez-Meizoso I., Jaime L., Santoyo S., Señoráns F. J., Cifuentes A. et Ibáñez E. (2010).** Subcritical water extraction and characterization of bioactive compounds from *Haematococcus pluvialis* microalga. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*, **51**: 456-463.
- [91] **Santoyo S., Rodríguez-Meizoso I., Cifuentes A., Jaime L., Reina G. G.-B., Señorans F. J. et Ibáñez E. (2009).** Green processes based on the extraction with pressurized fluids to obtain potent antimicrobials from *Haematococcus pluvialis* microalgae. *LWT-Food Science and Technology*, **42**: 1213-1218.
- [92] **Bhagavathy S., Sumathi P. et Bell I. J. S. (2011).** Green algae *Chlorococcum humicola* new source of bioactive compounds with antimicrobial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **1**: 1-7.
- [93] **Catarina Guedes A., Barbosa C. R., Amaro H. M., Pereira C. I. et Xavier Malcata F. (2011).** Microalgal and cyanobacterial cell extracts for use as natural antibacterial additives against food pathogens. *International Journal of Food Science & Technology*, **46**: 862-870.
- [94] **Najdenski H. M., Gigova L. G., Iliev I. I., Pilarski P. S., Lukavský J., Tsvetkova I. V., Ninova M. S. et Kussovski V. K. (2013).** Antibacterial and antifungal activities of selected microalgae and cyanobacteria. *International Journal of Food Science & Technology*, **48**: 1533-1540.
- [95] **Cadore J.P. et Bernard O. (2008).** La production de biocarburant lipidique avec des microalgues: promesses et défis. *Journal de la Société de Biologie*, **202**: 201-211.
- [96] **Phukan M. M., Chutia R. S., Konwar B. et Kataki R. (2011).** Microalgae *Chlorella* as a potential bioenergy feedstock. *Applied energy*, **88**: 3307-3312.

- [97] **Lv X., Zou L., Sun B., Wang J. et Sun M. Y. (2010).** Variations in lipid yields and compositions of marine microalgae during cell growth and respiration, and within intracellular structures. *The Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **391**: 73-83.
- [98] **Oren, A. (2005).** A hundred years of *Dunaliella* research: 1905-2005. *Saline systems*, **1**: 2-2.
- [99] **Nicolai F. et Baas Becking L. (1935).** Einige Notizen über Salzflagellaten. *Archiv Fur Protistenkunde*. **85**: 319-328.
- [100] **Lerche W. (1937).** Untersuchungen über Entwicklung und Fortpflanzung in der Gattung *Dunaliella*. *Archiv fur Protistenkunde*. **88**: 236-268.
- [101] **Butcher R. W. (1959).** An introductory account of the smaller algae of British coastal waters Part I. Introduction and *Chlorophyceae*. *Fish Investigation*, **4**: 1-74.
- [102] **Preisig H. R. (1992).** Morphology and taxonomy. In: *Dunaliella: Physiology, Biochemistry and Biotechnology*. Avron, M and Ben-Amotz A., CRC Press Boca Raton (Ed), USA., pp 1-15.
- [103] **Massyuk N. (1973).** Morphology, taxonomy, ecology and geographic distribution of the genus *Dunaliella* Teod. and prospects for its potential utilization. *Naukova Dumka Kiev*: 242-263.
- [104] **González M. A., Gómez P. I. et Polle J. E. (2009).** Taxonomy and phylogeny of the genus *Dunaliella*. In: *The Alga Dunaliella: Biodiversity, Physiology, Genomics, and Biotechnology*. Ben-Amotz, A., Polle Jürgen E. W., Subba R. D. V. Science Publishers (Ed),Enfield,, 15-44 pp.
- [105] **Assunção P., Jaen-Molina R., Caujape-Castells J., de la Jara A., Carmona L., Freijanes K. et Mendoza H. (2012).** Molecular taxonomy of *Dunaliella* (*Chlorophyceae*), with a special focus on *D. salina*: ITS2 sequences revisited with an extensive geographical sampling. *Aquatic Biosystems*, **8**: 2.
- [106] **Preetha K., John L., Subin C. S. et Vijayan K. K. (2012).** Phenotypic and genetic characterization of *Dunaliella* (*Chlorophyta*) from Indian salinas and their diversity. *Aquatic biosystems*, **8**: 27.
- [107] **Assunção P., Jaén-Molina R., Caujapé-Castells J., Wolf M., Buchheim M. A., de la Jara A., Freijanes K., Carmona L. et Mendoza H. (2013).** Phylogenetic analysis of ITS2 sequences suggests the taxonomic re-structuring of *Dunaliella viridis* (*Chlorophyceae*, *Dunaliellales*). *Phycological Research*, **61**: 81-88.
- [108] **Coleman A. W. (2003).** ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends in Genetics*, **19**: 370-375.

- [109] Mixson Byrd S., Burkholder J. M. et Zimba P. V. (2017). Environmental stressors and lipid production by *Dunaliella* spp. I. Salinity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **487**: 18-32.
- [110] Oren A. (2010). The alga *Dunaliella*. biodiversity, physiology, genomics and biotechnology. *Journal of Phycology*, **46**: 216-217.
- [111] Coleman A. W. et Pröschold T. (2005). Control of sexual reproduction. In: Algal Culturing Techniques. Robert Andersen, A, Elsevier (Ed)., pp 389-427.
- [112] Wei S., Bian Y., Zhao Q., Chen S., Mao J., Song C., Cheng K., Xiao Z., Zhang C. et Ma W. (2017). Salinity-induced palmella formation mechanism in halotolerant algae *Dunaliella salina* revealed by quantitative proteomics and phosphoproteomics. *Frontiers in plant science*, **8**: 810.
- [113] Mishra A., Mandoli A. et Jha B. (2008). Physiological characterization and stress-induced metabolic responses of *Dunaliella salina* isolated from salt pan. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, **35**: 1093-1101.
- [114] Goyal A. (2007). Osmoregulation in *Dunaliella*, Part I: Effects of osmotic stress on photosynthesis, dark respiration and glycerol metabolism in *Dunaliella tertiolecta* and its salt-sensitive mutant (HL 25/8). *Plant Physiology and Biochemistry*, **45**: 696-704.
- [115] Cifuentes A. S., González M. A., Inostroza I. et 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.
- [116] Baroli I. et Melis A. (1996). Photoinhibition and repair in *Dunaliella salina* acclimated to different growth irradiances. *Planta*, **198**: 640-646.
- [117] Jin E. et Polle J. E. (2009). Carotenoid biosynthesis in *Dunaliella* (*Chlorophyta*). In: The alga *Dunaliella*: biodiversity, physiology, genomics and biotechnology. Ben-Amotz A., Polle J. r. E. W. et Subba Rao D. V. *Science Publishers, Enfield.*, 147-171 pp.
- [118] Wu Z., Duangmanee P., Zhao P., Juntawong N. et Ma C. (2016). The effects of light, temperature, and nutrition on growth and pigment accumulation of three *Dunaliella salina* Strains isolated from saline soil. *Jundishapur Journal of Microbiology*, **9**: e26732.
- [119] Hosseini Tafreshi A. et Shariati M. (2009). *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. *Journal of Applied Microbiology*, **107**: 14-35.
- [120] Shaker S., Morowvat M. H. et Ghasemi Y. (2017). Effects of sulfur, iron and manganese starvation on growth, β -carotene production and lipid Profile of *Dunaliella salina*. *Journal of Young Pharmacists*, **9**: 43-46.

- [121] **Chen H. et Jiang J. G. (2009).** Osmotic responses of *Dunaliella* to the changes of salinity. *Journal of Cellular Physiology*, **219**: 251-258.
- [122] **Mishra A. et Jha B. (2009).** Isolation and characterization of extracellular polymeric substances from microalgae *Dunaliella salina* under salt stress. *Bioresource Technology*, **100**: 3382-3386.
- [123] **Chen H., Lao Y. M. et Jiang J. G. (2011).** Effects of salinities on the gene expression of a (NAD⁺) dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase in *Dunaliella salina*. *Science of The Total Environment*, **409**: 1291-1297.
- [124] **Prieto A., Pedro Cañavate J. et García-González M. (2011).** Assessment of carotenoid production by *Dunaliella salina* in different culture systems and operation regimes. *Journal of biotechnology*, **151**: 180-185.
- [125] **Paniagua-Michel J., Olmos-Soto J. et Ruiz M. A. (2012).** Pathways of carotenoid biosynthesis in bacteria and microalgae. *Methods in Molecular Biology*. **892**: 1-12.
- [126] **Raja R., Hemaiswarya S. et Rengasamy R. (2007).** Exploitation of *Dunaliella* for β -carotene production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **74**: 517-523.
- [127] **Solymosi K. et Marchand J. (2016).** Carotenoids of microalgae used in food industry and medicine. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **16**: 140-1172.
- [128] **Hu C. C., Lin J. T., Lu F. J., Chou F. P. et Yang D. J. (2008).** Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract. *Food Chemistry*, **109**: 439-446.
- [129] **Noviendri D., Hasrini R. F. et Octavianti F. (2011).** Carotenoids: Sources, medicinal properties and their application in food and nutraceutical industry. *Journal of Medicinal Plants Research*, **5**: 7119-7131.
- [130] **Stahl W. et Sies H. (2003).** Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, **24**: 345-351.
- [131] **Cazzonelli C. I. (2011).** Carotenoids in nature: insights from plants and beyond. *Functional Plant Biology*, **38**: 833-847.
- [132] **Hornero-Méndez D., Pérez-Gálvez A. et Mínguez-Mosquera M. I. (2001).** A rapid spectrophotometric method for the determination of peroxide value in food lipids with high carotenoid content. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **78**: 1151-1155.
- [133] **Britton G., Liaen-Jensen S. et Pfander H. (2008).** Carotenoids: natural functions. Birkhäuser Basel (Eds), Bâle,. 647 p.

- [134] **Jomova K. et Valko M. (2013).** Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **70**: 102-110.
- [135] **Rodriguez-Amaya D. B. (2001).** A guide to carotenoid analysis in foods. ILSI press (Ed), Washington. 71 p.
- [136] **Morin-Savy S. (2005).** Biosynthèse de caroténoïdes aromatiques hydroxylés par des bactéries non photosynthétiques: des carotènes aux xanthophylles. Thèse de Doctorat, option Microbiologie, Université de Bretagne Occidentale. 174 p.
- [137] **Takaichi S. (2011).** Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions. *Marine Drugs*, **9**: 1101-1118.
- [138] **Britton G. (2008).** Functions of intact carotenoids. In: Carotenoids. Britton, G., Liaaen-Jensen S., Pfander H., vol 4. Birkhäuser Basel, Springer (Eds)., pp 189-212.
- [139] **Khaneja R., Perez-Fons L., Fakhry S., Baccigalupi L., Steiger S., To E., Sandmann G., Dong T., Ricca E. et Fraser P. (2010).** Carotenoids found in *Bacillus*. *Journal of Applied Microbiology*, **108**: 1889-1902.
- [140] **Galvan D'Alessandro L. (2013).** Eco-procédés pour la récupération sélective d'antioxydants à partir d'*Aronia melanocarpa* et ses co-produits. Thèse de Doctorat, option ingénierie des fonctions biologiques, Université Lille 1. 195 p.
- [141] **Castro-Puyana M., Herrero M., Urreta I., Mendiola J. A., Cifuentes A., Ibáñez E. et Suárez-Alvarez S. (2013).** Optimization of clean extraction methods to isolate carotenoids from the microalga *Neochloris oleoabundans* and subsequent chemical characterization using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **405**: 4607-4616.
- [142] **Pradal D. (2016).** Eco-procédés d'extraction de polyphénols antioxydants à partir d'un co-produit agro-alimentaire. Thèse de Doctorat, option Ingénierie des Fonctions Biologiques, Université Lille 1, France. 266 p.
- [143] **Nikitenko I et Chemat F. (2015).** Ultrasound in process engineering. In: Green Process Engineering. Poux, M., Cognet P. et Gourdon C, CRC Press (Ed)., pp 168-188.
- [144] **Mason T., Paniwnyk L. et Lorimer J. (1996).** The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*, **3**: 253-260.
- [145] **Chemat F. et Khan M. K. (2011).** Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, **18**: 813-835.

- [146] Poux M., Cognet P. et Gourdon C. (2010). Génie des procédés durables: du concept à la concrétisation industrielle. Dunod (Ed). 475 p.
- [147] Macías-Sánchez M., Mantell C., Rodriguez M., de la, de la Ossa E. M., Lubián L. et Montero O. (2009). Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*. *Talanta*, **77**: 948-952.
- [148] Li Y., Fabiano-Tixier A. S., Tomao V., Cravotto G. et Chemat F. (2013). Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids based on the bio-refinery concept using sunflower oil as an alternative solvent. *Ultrasonics Sonochemistry*, **20**: 12-18.
- [149] Chuyen H. V., Nguyen M. H., Roach P. D., Golding J. B. et Parks S. E. (2018). Microwave-assisted extraction and ultrasound-assisted extraction for recovering carotenoids from Gac peel and their effects on antioxidant capacity of the extracts. *Food science & nutrition*, **6**: 189-196.
- [150] Urnau L., Colet R., Soares V. F., Franceschi E., Valduga E. et Steffens C. (2018). Extraction of carotenoids from *Xanthophyllomyces dendrorhous* using ultrasound assisted and chemical cell disruption methods. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, **96**: 1377-1381.
- [151] Liu Y., Chen S., Pu Y., Muhammad A., Hang M, Liu D. et Ye T. (2019). Ultrasound-assisted thawing of mango pulp: effect on thawing rate, sensory, and nutritional properties. *Food Chemistry*, **286**: 576-583.
- [152] Mustafa A. et Turner C. (2011). Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta*, **703**: 8-18.
- [153] Ramos L., Kristenson E. et Brinkman U. T. (2002). Current use of pressurised liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. *Journal of Chromatography*, **975**: 3-29.
- [154] Pronyk C. et Mazza G. (2009). Design and scale-up of pressurized fluid extractors for food and bioproducts. *Journal of Food Engineering*, **95**: 215-226.
- [155] Turner C. (2006). Overview of modern extraction techniques for food and agricultural samples. *Modern extraction techniques*, **926**: 3-19.
- [156] Giergielewicz-Możajska H., Dąbrowski L. et Namieśnik J. (2001). Accelerated solvent extraction (ASE) in the analysis of environmental solid samples. Some aspects of theory and practice. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **31**: 149-165.

- [157] Denery J. R., Dragull K., Tang C. et Li Q. X. (2004). Pressurized fluid extraction of carotenoids from *Haematococcus pluvialis* and *Dunaliella salina* and kavalactones from *Piper methysticum*. *Analytica Chimica Acta*, **501**: 175-181.
- [158] Derwenskus F., Metz F., Gille A., Schmid Staiger U., Briviba K., Schliemann U. et Hirth T. (2019). Pressurized extraction of unsaturated fatty acids and carotenoids from wet *Chlorella vulgaris* and *Phaeodactylum tricornutum* biomass using subcritical liquids. *GCB Bioenergy*, **11**: 335–344.
- [159] Castro-Puyana M., Pérez-Sánchez A., Valdés A., Ibrahim O., Suarez-Álvarez S., Ferragut J., Micol V., Cifuentes A., Ibáñez E. et García-Cañas V. (2017). Pressurized liquid extraction of *Neochloris oleoabundans* for the recovery of bioactive carotenoids with anti-proliferative activity against human colon cancer cells. *Food Research International*, **99**: 1048-1055.
- [160] Taucher J., Baer S., Schwerna P., Hofmann D., Hümmer M., Buchholz R. et Becker A. (2016). Cell disruption and pressurized liquid extraction of carotenoids from microalgae. *Journal of Thermodynamics and Catalysis*, **7**: 158-165.
- [161] Thong Deng H. (2011). Extraction et mise en forme (en liposomes) de phospholipides issus d'un co-produit par voie supercritique. Thèse de Doctorat, option Génie des Procédés, Université Bordeaux 1. 234 p.
- [162] Taylor L. T. (1996). Supercritical fluid extraction. Wiley-Interscience. John Wiley & Sons (Ed), New York. 181 p.
- [163] El Haib A. (2011). Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques. Thèse de Doctorat, option Chimie organique et catalyse, Université de Toulouse. 195 p.
- [164] Da Silva R. P. F. F., Rocha-Santos T. A. P. et Duarte A. C. (2016). Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. *TRAC Trends in Analytical Chemistry*, **76**: 40-51.
- [165] Lachos-Perez D., Baseggio A. M., Mayanga-Torres P. C., Maróstica M. R., Rostagno M. A., Martínez J. et Forster-Carneiro T. (2018). Subcritical water extraction of flavanones from defatted orange peel. *The Journal of Supercritical Fluids*, **138**: 7-16.
- [166] Cheng X., Qi Z., Burdyny T., Kong T. et Sinton D. (2018). Low pressure supercritical CO₂ extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* demonstrated on a microfluidic chip. *Bioresource Technology*, **250**: 481-485.
- [167] Molino A., Mehariya S., Iovine A., Larocca V., Di Sanzo G., Martino M., Casella P., Chianese S. et Musmarra D. (2018). Extraction of astaxanthin and lutein from microalgae *Haematococcus pluvialis* in the red phase using CO₂ supercritical fluid extraction technology with ethanol as co-solvent. *Marine Drugs*, **16**: 432.

- [168] **Mouahid A., Crampon C., Toudji S.-A. A. et Badens E. (2016).** Effects of high water content and drying pre-treatment on supercritical CO₂ extraction from *Dunaliella salina* microalgae: Experiments and modelling. *The Journal of Supercritical Fluids*, **116**: 271-280.
- [169] **Abrahamsson V., Jumaah F. et Turner, C. (2018).** Continuous multicomponent quantification during supercritical fluid extraction applied to microalgae using in-line UV/Vis absorption spectroscopy and on-line evaporative light scattering detection. *The journal of Supercritical Fluids*, **131**: 157-165.
- [170] **Benabdallah A. M. (2014).** Screening de souches extrêmophiles halophiles du genre *Bacillus* de la Sebka D'Oran (caractérisation phénotypique). Mémoire de Master, option Biologie, Université de Tlemcen. 100 p.
- [171] **Hughes R. H et Hughes J.S. (1992).** A directory of African wetlands. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK; UNEP, Nairobi, Kenya and WCMC, Cambridge UK. 820 p.
- [172] **Boutaiba S., Hacene H., Bidle K. A. et Maupin-Furlow J. A. (2011).** Microbial diversity of the hypersaline Sidi Ameur and Himalatt Salt Lakes of the Algerian Sahara. *Journal of Arid Environments*, **75**: 909-916.
- [173] **Senni R. (2014).** Etude de la diversité de la végétation des zones humides de Zahrez Chergui et Gharbi (Djelfa) et de Chott el Hodna (M'sila), Ecole nationale supérieure d'agronomie. Thèse de Doctorat Es-Sciences, option Ecologie végétale. 145 p.
- [174] **Guillard R. R. et Ryther J. H. (1962).** Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nanta* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*, **8**: 229-239.
- [175] **ISO 22743 (2006).** Qualité de l'eau. Dosage des sulfates: méthode par analyse en flux continu (CFA).
- [176] **Semenenko V. et Abdullaev A. (1980).** Parametric control of beta-carotene biosynthesis in *Dunaliella salina* cells under conditions of intensive cultivation. *Soviet plant physiology*.
- [177] **Johnson M. K., Johnson E. J., Mac Elroy R. D., Speer H. L. et Bruff B. S. (1968).** Effects of salts on the halophilic alga *Dunaliella viridis*. *Journal Bacteriology*, **95**: 1461-1468.
- [178] **Andersen R. A. (2005).** Algal culturing techniques. Elsevier Academic Press (Eds), new York. 596 p.
- [179] **Singer-Sam J. (1989).** Use of Chelex to improve the PCR signal from a small number of cells. *Forum for PCR Users*, **3**: 11.

- [180] Goff L. J., Moon D. A. et Coleman A. W. (1994). Molecular delineation of species and species relationships in the red algal *Agarophytes gracilariopsis* and *Gracilaria* (*Gracilariales*). *Journal of Phycology*, **30**: 521–537.
- [181] Díez B., Pedrós-Alió C., Marsh T. et Massana R. (2001). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with Other Molecular Techniques. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**: 2942-2951.
- [182] Nozaki H., Itoh M., Sano R., Uchida H., Watanabe M. M. et Kuroiwa T. (1995). Phylogenetic relationships within the colonial *Volvocales* (*Chlorophyta*) inferred from *rbcl* gene sequence data. *Journal of Phycology*, **31**: 970–979.
- [183] Sanger F., Nicklen S. et Coulson A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, **74**: 5463-5467.
- [184] Hall T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**: 95-98.
- [185] Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. et Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **30**: 2725-2729.
- [186] Saitou N. et Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**: 406-425.
- [187] Zamani H., Moradshahi A. et Karbalaeei-Heidari H. R. (2011). Characterization of a new *Dunaliella salina* strain MSI-1 based on nuclear rDNA ITS sequences and its physiological response to changes in composition of growth media. *Hydrobiologia*, **658**: 67-75.
- [188] Morowvat M. H. et Ghasemi Y. (2016). Culture medium optimization for enhanced β -carotene and biomass production by *Dunaliella salina* in mixotrophic culture. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **7**: 217-223.
- [189] Wellburn A. R. (1994). The spectral determination of chlorophyll a and chlorophyll b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol*, **144**: 307-313.
- [190] Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et Randall R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**: 265-275.
- [191] Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. T. et Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, **28**: 350-356.

- [192] Bligh E. G. et Dyer W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, **37**: 911-917.
- [193] Alonso-Salces R., Korta E., Barranco A., Berrueta L., Gallo B. et Vicente F. (2001). Pressurized liquid extraction for the determination of polyphenols in apple. *Journal of Chromatography*, **933**: 37-43.
- [194] Gourguillon L., Destandau É., Lobstein A. et Lesellier É. (2016). Comparaison de différentes méthodes d'extraction d'acides dicaféoylquiniques à partir d'une plante halophile. *Comptes Rendus Chimie*, **19**: 1133-1141.
- [195] Prat D., Wells A., Hayler J., Sneddon H., McElroy C. R., Abou-Shehada S. et Dunn P. J. (2015). CHEM21 selection guide of classical-and less classical-solvents. *Green Chemistry*, **18**: 288-296.
- [196] Tepe B., Eminagaoglu O., Akpulat H. A. et Aydin E. (2007). Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. *verticillata* and *S. verticillata* (L.) subsp. *amasiaca* (Freyn & Bornm.) Bornm. *Food Chemistry*, **100**: 985-989.
- [197] Takouridis S. J., Tribe D. E., Gras S. L. et Martin G. J. (2015). The selective breeding of the freshwater microalga *Chlamydomonas reinhardtii* for growth in salinity. *Bioresource Technology*, **184**: 18-22.
- [198] Wang S. B., Chen F., Sommerfeld M. et Hu Q. (2004). Proteomic analysis of molecular response to oxidative stress by the green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Planta*, **220**: 17-29.
- [199] Lurling M. et Beekman W. (2006). Palmelloids formation in *Chlamydomonas reinhardtii*: defence against rotifer predators. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, **42**: 65-72.
- [200] McLachlan J. (1960). The culture of *Dunaliella tertiolecta* Butcher a euryhaline organism. *Canadian Journal of Microbiology*, **6**: 367-379.
- [201] Sathasivam R., Kermanee P., Roytrakul S. et Juntawong N. (2012). Isolation and molecular identification of β -carotene producing strains of *Dunaliella salina* and *Dunaliella bardawil* from salt soil samples by using species-specific primers and internal transcribed spacer (ITS) primers. *African Journal of Biotechnology*, **11**: 16677-16687.
- [202] Emami K., Hack E., Nelson A., Brain C. M., Lyne F. M., Mesbahi E., Day J. G. et Caldwell G. S. (2015). Proteomic-based biotyping reveals hidden diversity within a microalgae culture collection: An example using *Dunaliella*. *Scientific Reports*, **5**: 10036.

- [203] Shang C., Zhu S., Wang Z., Qin L., Alam M. A., Xie J. et Yuan Z. (2017). Proteome response of *Dunaliella parva* induced by nitrogen limitation. *Algal Research*, **23**: 196-202.
- [204] Beuzenberg V., Smith K. F. et Packer M. A. (2014). Isolation and characterization of halotolerant *Dunaliella* strains from Lake Grassmere/Kapara Te Hau, New Zealand. *New Zealand Journal of Botany*, **52**: 136-152.
- [205] Abu-Rezq T. S., Al-Hooti, S. et Jacob D. A. (2010). Optimum culture conditions required for the locally isolated *Dunaliella salina*. *Journal of Algal Biomass Utilization*, **1**: 12-19.
- [206] Ahmed R. A., He M., Aftab R. A., Zheng S., Nagi M., Bakri R. et Wang C. (2017). Bioenergy application of *Dunaliella salina* SA 134 grown at various salinity levels for lipid production. *Scientific Reports*, **7**: 8118.
- [207] Chen H., Jiang J. G. et Wu G. H. (2009). Effects of salinity changes on the growth of *Dunaliella salina* and its isozyme activities of glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**: 6178-6182.
- [208] Hexin L., Xianggan C., Fazli W., Feng X., Cheng Z. et Shiru J. (2016). Analysis of the physiological and molecular responses of *Dunaliella salina* to acronutrient deprivation. *Plos one*, **11**: e0152226.
- [209] Marín N., Morales F., Lodeiros C. et Tamigneaux E. (1998). Effect of nitrate concentration on growth and pigment synthesis of *Dunaliella salina* cultivated under low illumination and preadapted to different salinities. *Journal of applied phycology*, **10**: 405-411.
- [210] Gomez P. I., Barriga A., Cifuentes A. S. et Gonzalez M. A. (2003). Effect of salinity on the quantity and quality of carotenoids accumulated by *Dunaliella salina* (strain CONC-007) and *Dunaliella bardawil* (strain ATCC 30861) *Chlorophyta*. *Biological research*, **36**: 185-192.
- [211] Nikookar K., Moradshahi A. et Kharati M. (2004). Influence of salinity on the growth, pigmentation and ascorbate peroxidase activity of *Dunaliella salina* isolated from Maharlu salt lake in Shiraz. *Iranian Journal of Science and Technology (Sciences)*, **28**: 117-125.
- [212] Fazeli M. R., Tofighi H., Samadi N., Jamalifar H. et Fazeli A. (2006). Carotenoids accumulation by *Dunaliella tertiolecta* (Lake Urmia isolate) and *Dunaliella salina* (CCAP 19/18) under stress conditions. *Daru Journal of Pharmaceutical Sciences*, **14**: 146-150.
- [213] Cifuentes A. S., González M., Conejeros M., Dellarossa V. et Parra O. (1992). Growth and carotenogenesis in eight strains of *Dunaliella salina* Teodoresco from Chile. *Journal of Applied Phycology*, **4**: 111.

- [214] Misra R., Guldhe A., Singh P., Rawat I., Stenström T. A. et Bux F. (2015). Evaluation of operating conditions for sustainable harvesting of microalgal biomass applying electrochemical method using non sacrificial electrodes. *Bioresource Technology*, **176**: 1-7.
- [215] Amaro H. M., Guedes A. C. et Malcata F. X. (2011). Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy*, **88**: 3402-3410.
- [216] Dassey A. J. et Theegala C. S. (2013). Harvesting economics and strategies using centrifugation for cost effective separation of microalgae cells for biodiesel applications. *Bioresource Technology*, **128**: 241-245.
- [217] Gultom S. et Hu B. (2013). Review of microalgae harvesting via co-pelletization with filamentous fungus. *Energies*, **6**: 5921-5939.
- [218] Milledge J. J. et Heaven S. (2013). A review of the harvesting of micro-algae for biofuel production. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, **12**: 165-178.
- [219] Singh G. et Patidar S. K. (2018). Microalgae harvesting techniques: A review. *Journal of environmental management*, **217**: 499-508.
- [220] García-Pérez J. S., Beuckels A., Vandamme D., Depraetere O., Foubert I., Parra R. et Muylaert K. (2014). Influence of magnesium concentration, biomass concentration and pH on flocculation of *Chlorella vulgaris*. *Algal Research*, **3**: 24-29.
- [221] Pérez L., Salgueiro J. L., Maceiras R., Cancela Á. et Sánchez Á. (2017). An effective method for harvesting of marine microalgae: pH induced flocculation. *Biomass and Bioenergy*, **97**: 20-26.
- [222] Pirwitz K., Rihko-Struckmann L. et Sundmacher K. (2015). Comparison of flocculation methods for harvesting *Dunaliella*. *Bioresource Technology*, **196**: 145-152.
- [223] Ríos S. D., Castañeda J., Torras C., Farriol X. et Salvadó J. (2013). Lipid extraction methods from microalgal biomass harvested by two different paths: screening studies toward biodiesel production. *Bioresource Technology*, **133**: 378-388.
- [224] Borges L., Caldas S., Montes D'Oca M. G. et Abreu P. C. (2016). Effect of harvesting processes on the lipid yield and fatty acid profile of the marine microalga *Nannochloropsis oculata*. *Aquaculture Reports*, **4**: 164-168.

- [225] Dawidowicz A. L. et Wianowska D. (2005). PLE in the analysis of plant compounds: Part I. The application of PLE for HPLC analysis of caffeine in green tea leaves. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **37**: 1155-1159.
- [226] Sánchez Camargo A.P., Ibáñez E., Cifuentes A et Herrero M. (2017). Bioactives obtained from plants, seaweeds, microalgae and food by-products using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction. In: Ibáñez E et Cifuentes A, *Comprehensive Analytical Chemistry* (Ed), Elsevier: 27-51 pp.
- [227] Herrero M., del Pilar Sanchez-Camargo A., Cifuentes A. et Ibanez E. (2015). Plants, seaweeds, microalgae and food by-products as natural sources of functional ingredients obtained using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction. *TRAC Trends in Analytical Chemistry*, **71**: 26-38.
- [228] Plaza M. et Turner C. (2015). Pressurized hot water extraction of bioactives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **71**: 39-54.
- [229] Sun H., Ge X., Lv Y. et Wang A. (2012). Application of accelerated solvent extraction in the analysis of organic contaminants, bioactive and nutritional compounds in food and feed. *Journal of Chromatography*, **1237**: 1-23.
- [230] Herrero M., Castro-Puyana M., Mendiola J. A. et Ibañez E. (2013). Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds. *TRAC Trends in Analytical Chemistry*, **43**: 67-83.
- [231] Koo S. Y., Cha K. H., Song D. G., Chung D. et Pan C. H. (2012). Optimization of pressurized liquid extraction of zeaxanthin from *Chlorella ellipsoidea*. *Journal of Applied Phycology*, **24**: 725-730.
- [232] Jaime L., Rodríguez-Meizoso I., Cifuentes A., Santoyo S., Suarez S., Ibáñez E. et Señorans F. J. (2010). Pressurized liquids as an alternative process to antioxidant carotenoids extraction from *Haematococcus pluvialis* microalgae. *LWT-Food Science and Technology*, **43**: 105-112.
- [233] Damant, A. P. (2011). Food colourants. In: handbook of textile and industrial dyeing. Clark. M. Woodhead Publishing., 252-305 pp.
- [234] Lucini L., Pellizzoni M., Baffi C. et Molinari G. P. (2012). Rapid determination of lycopene and β -carotene in tomato by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **92**: 1297-1303.
- [235] Strati I. F. et Oreopoulou V. (2011). Process optimisation for recovery of carotenoids from tomato waste. *Food Chemistry*, **129**: 747-752.
- [236] Lin J. T., Lee Y. C., Hu C. C., Shen Y.-C., Lu F. J. et Yang D. J. (2010). Evaluation of carotenoid extract from *Dunaliella salina* against cadmium-Induced cytotoxicity and transforming growth factor induced expression of smooth muscle α -Actin with rat liver cell lines. *Journal of Food & Drug Analysis*, **18**: 301-306.

- [237] **Herrero M., Jaime L., Martín-Álvarez P. J., Cifuentes A. et Ibáñez E. (2006).** Optimization of the extraction of antioxidants from *Dunaliella salina* microalga by pressurized liquids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**: 5597-5603.
- [238] **Robman L., Vu H., Hodge A., Tikellis G., Dimitrov P., McCarty C. et Guymer R. (2007).** Dietary lutein, zeaxanthin, and fats and the progression of age-related macular degeneration. *Canadian Journal of Ophthalmology*, **42**: 720-726.
- [239] **Rammuni M., Ariyadasa T. U., Nimarshana P. et Attalage R. (2018).** Comparative assessment on the extraction of carotenoids from microalgal sources: Astaxanthin from *H. pluvialis* and β -carotene from *D. salina*. *Food Chemistry*. **277**: 128-134.
- [240] **Shahidi F. et Ambigaipalan P. (2015).** Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: antioxidant activity and health effects: A review. *Journal of functional foods*, **18**: 820-897.
- [241] **Al-Snafi A. E. (2015).** Therapeutic properties of medicinal plants: a review of plants with antioxidant activity (part 1). *International Journal of Pharmacology and Toxicology*, **6**: 159-182.
- [242] **Cakmak T., Angun P., Demiray Y. E., Ozkan A. D., Elibol Z. et Tekinay T. (2012).** Differential effects of nitrogen and sulfur deprivation on growth and biodiesel feedstock production of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology and Bioengineering*, **109**: 1947-1957.
- [243] **Jordan K. et McAuliffe O. (2018).** *Listeria monocytogenes* in Foods. *Advances in Food and Nutrition Research*. **86**: 181-213.
- [244] **Cakmak Y. S., Kaya M. et Asan-Ozusaglam M. (2014).** Biochemical composition and bioactivity screening of various extracts from *Dunaliella salina*, a green microalga. *EXCLI Journal*, **13**: 679.
- [245] **Venkatesan R., Karthikayen R., Periyannayagi R., Sasikala V. et Balasubramanian T. (2007).** Antibacterial activity of the marine diatom, *Rhizosolenia alata* (Brightwell, 1858) against human pathogens. *Research Journal of Microbiology*, **2**: 98-100.
- [246] **Walter C. et Mahesh R. (2000).** Antibacterial and antifungal activities of some marine diatoms in culture. *Indian Journal of Marine Sciences*. **29**: 238-242.
- [247] **Pawlik-Skowrońska B. (2003).** Resistance, accumulation and allocation of zinc in two ecotypes of the green alga *Stigeoclonium tenue* Kütz. Coming from habitats of different heavy metal concentrations. *Aquatic Botany*, **75**: 189-198.
- [248] **Suresh A., Praveenkumar R., Thangaraj R., Oscar F. L., Baldev E., Dhanasekaran D. et Thajuddin N. (2014).** Microalgal fatty acid methyl ester a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, **4**: 979-984.

- [249] **Mayer A. et Hamann M. (2005).** Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Comparative Biochemistry & Physiology*, **140**: 265-286.
- [250] **Cardozo K. H., Guaratini T., Barros M. P., Falcão V. R., Tonon A. P., Lopes N. P., Campos S., Torres M. A., Souza A. O. et Colepicolo P. (2007).** Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **146**: 60-78.

ANNEXE N° 1

PROTOCOLES DE PREPARATION DES MILIEUX DE CULTURE UTILISÉS

1. Milieu SEMENENKO-ABDULLAEV (Semenenko et Abdullaev, 1980)

Ajouter à 600 mL d'eau distillée

- NaCl	58,44 g (1M)
- Tris	6 g
- Solution Fe-EDTA	1 mL/L
- Micronutrients Hunter	1 mL/L

Ajuster le pH entre 7,9 - 8,0 avec HCl 35 %, ensuite ajouter 25ml/L des solutions stock du phosphate et du nitrate. Adjuster le pH à 7,5. Compléter à 1 L avec de l'eau distillée et autoclaver at 120 °C pendant 20 min.

Note: pour le milieu solide, ajouter 2% d'Agar.

- **Préparation des solutions stocks:**

Fe-EDTA SOLUTION

- EDTA	37,00 g
- FeSO ₄ · 7H ₂ O	9,00 g

Compléter à 1 L avec de l'eau distillée et conserver à 4 °C.

MICRONUTRIENTS HUNTER

- EDTA	50,00 g
- ZnSO ₄ · 7H ₂ O	22,00 g
- H ₃ BO ₃	11,40 g
- MnCl ₂ · 4H ₂ O	5,06 g
- Fe SO ₄ · 7H ₂ O	4,99 g
- CoCl ₂ · 6H ₂ O	1,61 g
- CuSO ₄ · 5H ₂ O	1,57 g
- (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	1,10 g

Compléter à 1 L avec de l'eau distillée et conserver à 4 °C.

SOLUTION PHOSPHATE

- KH_2PO_4	27,20 g
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	32,12 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	19,68 g

Compléter à 1 L avec de l'eau distillée et conserver à 4 °C.

NITRATES SOLUTION

- NaNO_3	34,00 g
- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	14,24 g

Compléter à 1 L avec de l'eau distillée et conserver à 4 °C.

2. Milieu f/2 (Guillard et Ryther, 1962)

- **Solutions stocks**

- NaNO_3 75 g/L
- NaH_2PO_4 5 g/L
- Vitamines:
 - Biotine 1mg dans 10 mL
 - Vitamine B12 1mg dans 1ml
 - Thiamine HCl 0,2 g/L

- Solution trace

	<u>100 mL</u>
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1 g
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,63 g

Ajouter à 950 mL d'eau de mer filtrée :

Solution NaNO_3	1 mL
Solution NaH_2PO_4	1 mL
Solution trace	1 mL
Solution de vitamine	0,5 mL

Compléter à 1 L avec de l'eau distillée, ajuster le pH à 7,5 et autoclaver à 120 °C pendant 20 min.

3. Milieu Johnson (Johnson *et al.*, 1968)

NaCl	58,4 g/L
MgCl ₂ · 6H ₂ O	1,5 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5 g/L
KCl	0,2 g/L
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,2 g/L
KNO ₃	1 g/L
NaHCO ₃	0,043 g/L
KH ₂ PO ₄	0,035 g/L
Solution ferrique	10 mL
Solution trace	10 mL

Ajuster le pH à 7,5 et autoclaver à 120 °C pendant 20 min.

Solution ferrique	Pour 1 L
Na ₂ EDTA	189 mg
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	244 mg
Solution trace	Pour 1L
H ₃ BO ₃	61 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	38 mg
CuSO ₄ · 5H ₂ O	6 mg
CoCl ₂ · 6H ₂ O	5,1 mg
ZnCl ₂	4,1 mg
MnCl ₂ · 4H ₂ O	4,1 mg

4. Gélose nutritive glucosée

Peptone de caséine	5 g
Extrait de viande	1 g
Extrait de levure	2 g
NaCl	5 g
Glucose	10 g
Agar	18 g

Compléter à 1 L avec de l'eau distillée, ajuster le pH à 7 et autoclaver à 120 °C pendant 20 min.

ANNEXE N° 2

COMPOSITION DES SOLUTIONS UTILISÉES LORS DE LA PCR
et
PROPRIÉTÉS CHIMIQUES DES SOLVANTS UTILISÉS LORS DE L'EXTRACTION
DES PIGMENTS CAROTÉNOIDES

1. Solution Tris-EDTA « TE »

EDTA 0,5 M (pH 8)	0,2 mL
Tris HCl 1 M (pH 8)	1 mL
Eau distillée	100 mL
Stériliser à 120°C pendant 20 min. Conserver à température ambiante	

2. Solution « TAE »

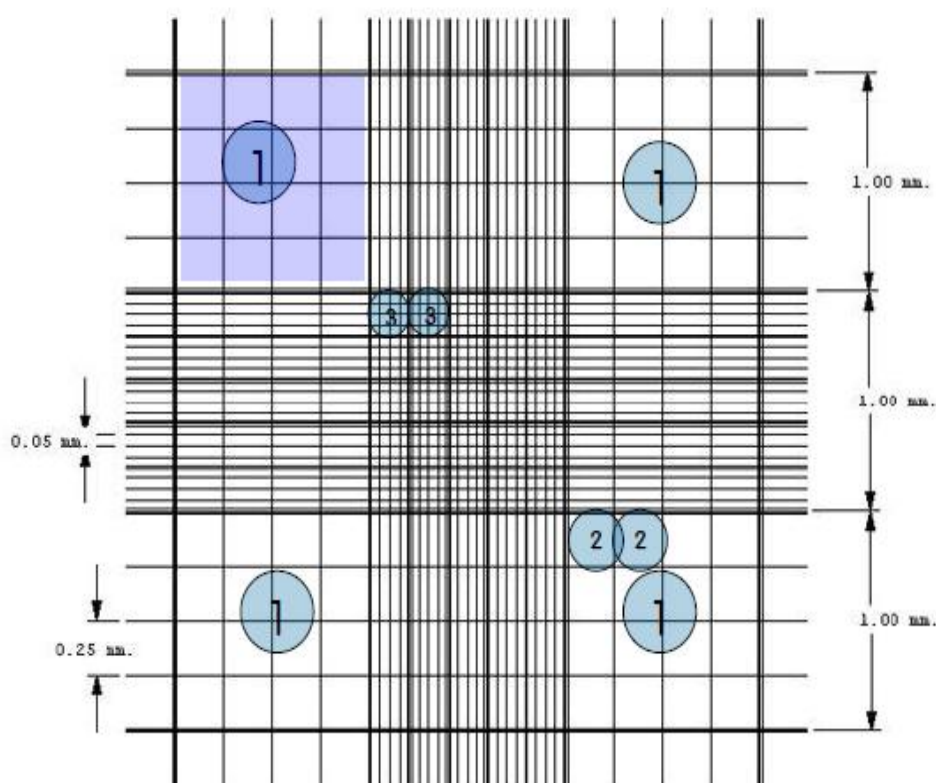
Tris	121 g
Acide acétique glacial	28,55 mL
EDTA 0,5 M (pH 8)	50 mL
Eau distillée	500 mL
Stériliser à 120°C pendant 20 min. Conserver à température ambiante	

3. Propriétés chimiques des solvants employés lors de l'extraction assistée par ultrasons et par liquides pressurisés.

Solvant	Formule chimique	Indice de polarité	Point d'ébullition (°C)
<i>n</i> -Hexane	C ₆ H ₁₄	0	69
Isobutanol	C ₄ H ₁₀ O	3,9	107,9
Acétate d'éthyle	C ₄ H ₈ O ₂	4,3	77
Isopropanol	C ₃ H ₈ O	4,3	97
Ethanol	C ₂ H ₆ O	5,2	78,5
Acétone	C ₃ H ₆ O	5,4	56,2

ANNEXE N° 3

METHODE DE COMPTAGE PAR LA CELLULE DE NEUBAUER

**Carré 1**

Nombre de cellules/mL = moyenne des cellules dans le carré 1 /0,0001

Carré 2

Nombre de cellules/mL = moyenne des cellules dans le carré 2 /0,000625

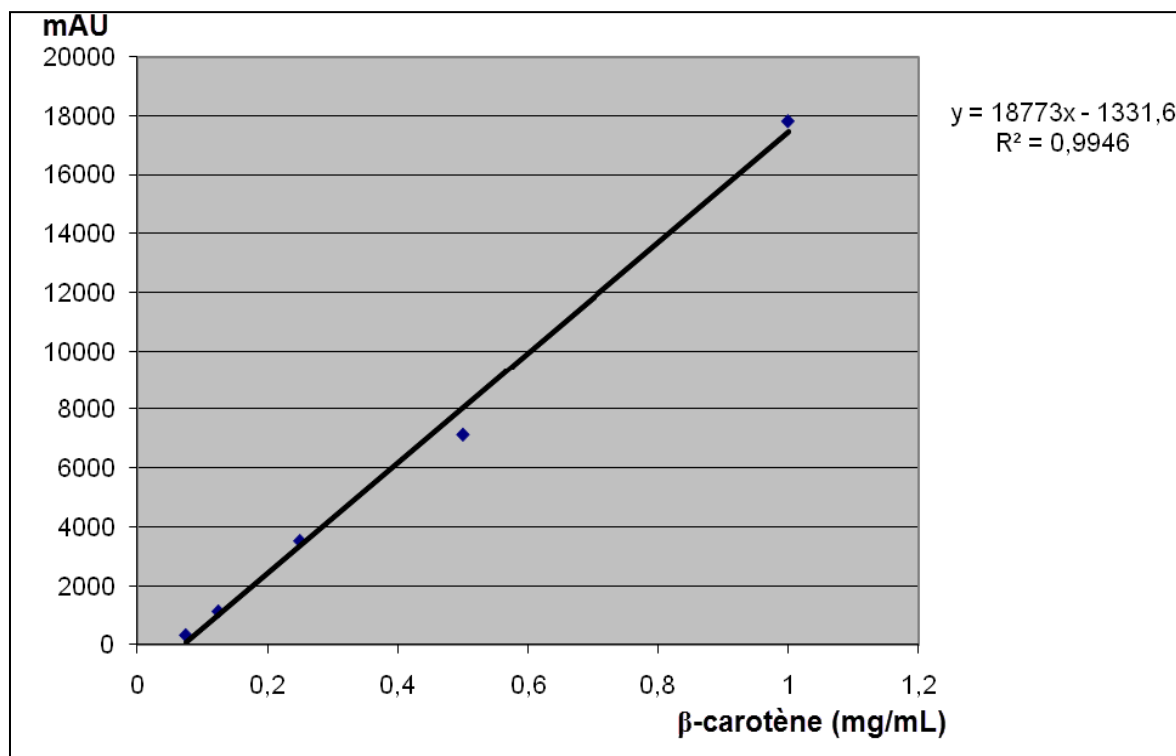
Carré 3

Nombre de cellules/mL = moyenne des cellules dans le carré 3 /0,000004

Carré 4 (petite partie du carré 3)

Nombre de cellules/mL = moyenne des cellules dans le carré 4 /0,00000025

ANNEXE N° 4

Courbe d'étalonnage du β -carotène et chromatogramme des principaux extraits

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

1. Publication internationale

Yaiche Achour H., Doumandji A., Bouras N., Sabaou N and Assunção P. **(2019)**. Isolation, Molecular Identification and The Carotenogenesis Process of the Microalgae *Dunaliella salina* Strain DunaDZ1 Isolated from an Algerian Salt Lake. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 19, 399-407.

2. Publication nationale

Yaiche Achour H., Doumandji A., Bouras N., Sabaou N and Assunção P. **(2018)**. Isolation and molecular identification of two strains of microalgae from Sidi Ameur salt lake in Algeria. *Algerian Journal of Arid Environment*, 8 (1): 4-10.

3. Communications internationales

Yaiche Achour H., Doumandji A. et Assunção P. **(2016)**. Isolement, identification moléculaire et caractérisation physio-morphologique de la microalgue halotolérante *Dunaliella* des salines Algériennes. Les 7^{ème} journées scientifiques internationales sur la valorisation des bioressources, 29-30 Avril et 1 Mai 2016, Sousse, Tunisie.

Yaiche Achour H. et Doumandji A. **(2017)**. Induction de la caroténogénèse chez la microalgue *Dunaliella salina* isolée du Sahara Algérien. Congrès International sur la Valorisation et la Préservation de la Biomasse (CI-VAPB 2017), 5 et 6 novembre 2017, Université M'Hamed Bougara de Boumerdès, Algérie.

4. Communications nationales

Yaiche Achour H., Doumandji A. et Ramdani M. **(2014)**. Optimisation des conditions de culture de la microalgue *Dunaliella* autochtone isolée et sa caractérisation nutritionnelle et biologique. 3^{ème} WISECC Workshop International sur les Stress Environnementaux et la Conduite des Cultures, du 22-24 mars 2014, Blida, Algeria.

Yaiche Achour H. et Doumandji A. (2016). *Dunaliella salina* (Chlorophyceae) microalgae isolated from Algerian salt lake, morphological and physiological characterization. 1^{ère} journées sur l'Écotoxicologie, 29 novembre et 1 décembre 2016, Blida, Algérie.

Yaiche Achour H. et Doumandji A. (2016). Caractérisation morphologique et physiologique sous conditions de stress au sein de l'espèce microalgale *Dunaliella salina* isolée à partir des sebkhas Algériennes. 4^{ème} WISECC Workshop International sur les Stress Environnementaux et la Conduite des Cultures, 13 et 14 décembre 2016, Blida, Algérie.



PROOF

RESEARCH PAPER

Isolation, Molecular Identification and the Carotenogenesis Process of the Microalgae *Dunaliella salina* Strain DunaDZ1 Isolated from an Algerian Salt Lake

Hafsa Yaiche Achour^{1,*} , Amel Doumandji², Noureddine Bouras^{3,4}, Nasseridine Sabaou⁴, Patricia Assunção⁵

¹ Laboratoire de Recherche de Biotechnologies des Productions Végétales, Biotechnology Department, Life Science faculty, Blida 1 University, BP 270, 09000, Blida, Algeria.

² Laboratoire de Recherche de Biotechnologies des Productions Végétales, Agri-Food Department, Life Science faculty, Blida 1 University, BP 270, 9000, Blida, Algeria.

³ Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre, Université de Ghardaïa, 47000, Ghardaïa, Algeria.

⁴ Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM), Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger, Algeria.

⁵ Instituto Tecnológico de Canarias (ITC), Departamento de Biotecnología, División de Investigación y Desarrollo Tecnológico, Pozolquierdo, 35119, Sta. Lucía, Canary Islands, Spain.

Article History

Received 11 January 2018

Accepted 07 May 2018

First Online 15 May 2018

Corresponding Author

Tel.: +213.777 373413

E-mail: hafsa_yah@hotmail.fr

Keywords

Dunaliella

Taxonomy

ITS

rbcl

Carotenoids

Abstract

Algeria has a high algal biodiversity, which is of great interest and should be exploited. Isolation of *Dunaliella* strain DunaDz1 from SidiAmeur Lake in Algeria was carried out in this study. The aim of this research was to identify the isolated strain by morphological and molecular taxonomy using ITS and rbcl genes. The effect of two stress factors, salinity and nitrate starvation on the carotenoids accumulation in *Dunaliella* strain was investigated on f/2 and Johnson media. The results for both genes showed that strain DunaDz1 is part of a clade containing several strains of *D. salina*. The strain grew well in Johnson medium, with a cell number of 56.09×10^5 cell/ml and a chlorophyll *a* amount of 63.63 µg/ml. Salt stress led to a noticeable increase in the total carotenoids levels of strain DunaDz1, 23.68 ± 0.12 and 23.15 ± 0.23 pg/cell, for f/2 and Johnson media, respectively. In nitrate starved media a lesser amount was recorded comparing with salt stress: 11.42 ± 0.22 and 16.2 ± 0.24 pg/cell, for f/2 and Johnson media, respectively. The combination of these two factors was more effective on f/2 medium than Johnson medium.

Introduction

Dunaliella is a unicellular, eukaryotic and halotolerant microalgae. This genus is grouped in the class *Chlorophyceae*, the order *Dunaliellales* and the family *Dunaliellaceae*. Cells are motile with two flagella. The main morphological characteristic of the *Dunaliella* genus is the lack of a rigid wall (Shariati & Hadi, 2011).

Molecular taxonomy is an advanced and reliable method for the characterization and differentiation of morphological plastic organisms (Preetha, John, Subin, & Vijayan, 2012; Olmos Soto, 2015). Identification of *Dunaliella* species/strains has already been the subject of morphological, physiological and molecular studies (Hexin *et al.*, 2016; Kim, Ahn, Jeon, & Jin, 2017; Shaker, Morowvat, & Ghasemi, 2017). Internal Transcribed Spacer (ITS) regions have been frequently utilized for

discrimination of genetic variation in green algae and to study the phylogeny and taxonomy of *Dunaliella*, as well as the ribulose-bisphosphate carboxylase (rbcl) gene (Coleman, Suarez, & Goff, 1994; González, Coleman, Gómez, & Montoya, 2001; Buchheim, Kirkwood, Buchheim, Verghese, & Henley, 2010). The ITS region is one of the more frequently utilized regions at the genus and species levels (Hejazi, Barzegari, Gharajeh, & Hejazi, 2010; Preetha *et al.*, 2012). However, the main difficulty of performing phylogenetic analyses of the genus *Dunaliella* is the misinformation available at culture collections and GenBank regarding the identification of strains and sequences. The taxonomy of the whole genus *Dunaliella* should be re-examined (Assuncao *et al.*, 2012).

Dunaliella salina (Dunal) Teodor. is known as a

famous β -carotene producer, and could accumulate the later up to 10% of its dry cell weights. β -carotene is one of the most precious nutraceuticals of both preventive and therapeutics importance in medicine and pharmacy. The pigment β -carotene is in high demand as an antioxidant and as a food coloring agent (Shaker *et al.*, 2017). Other species belonging to the genus *Dunaliella* can also accumulate β -carotene as *D. parva* W. Lerche. and *D. pseudosalina* Massjuk & Radcz., but the amount is less than *D. salina* (Borowitzka & Siva, 2007).

Under stress conditions, such as following an osmotic shock, *Dunaliella* alter their cell diameter and become spherical by involving glycerol synthesis, and the cellular glycerol content change (Xu, Ibrahim, & Harvey, 2016). *D. salina* accumulates a large amount of β -carotene when subjected to adverse conditions, such as high salinity and nitrate deprivation, as well as other factors (e.g., high light intensity and temperature) (Hexin *et al.*, 2016). In the carotenogenic species, numerous oily droplets of carotenoids accumulate in the inner thylakoid spaces, in the chloroplast, and/or in the cytoplasm. These usually form initially at the chloroplast periphery and then spread throughout the chloroplast as the carotenoid content increases (Borowitzka & Siva, 2007). The optimal conditions for carotenogenesis in *D. salina* are those that limit growth and include exposure to high salinity and nitrate depletion (Subramaniyan, Munuswamy, Chinnasamy, Sailendra, & Ramasamy, 2013). To deal with the problem of growth inhibition, a two-phase method is proposed and developed. This method consists of biomass accumulation in the first stage with low β -carotene to chlorophyll ratio; after which the culture is then transferred to the second stage, diluted to about one third and induced for carotenogenesis (Borowitzka & Borowitzka, 1990; Ben-Amotz, 1995).

However, microalgae, especially *Dunaliella*, are not investigated and characterized taxonomically from Algerian salt lakes. This research was conducted to isolate a strain of *Dunaliella*, to study the morphological characteristics, to identify the isolated strain by means of molecular tools, as well as studying the optimal conditions for carotenogenesis by high salinity, nitrate starvation, and the combination of these two factors on the isolated strain of *Dunaliella*.

Materials and Methods

Site Description and *Dunaliella* Isolation

Water sample was collected in 250 ml sterile flasks from Sidi Ameur sebkha (shallow salt lake), which is located between M'Sila and Djelfa provinces (latitude 35.27 °N, longitude 3.68 °E), in Algeria.

Multiple physical parameters of the water were analyzed: pH using Hanna pH meter, electrical conductivity (EC) with multi-parameters WTW Multi 340i, and salinity with a refractometer Hanna instruments RS100. Calcium, magnesium, sodium, potassium and chloride were analyzed with an autoanalyser SAN-system by reference to calibration curve. The method ISO 22743 (2006) was used to estimate the level of sulfate in water.

Samples were plated on f/2 medium (Guillard & Rytter, 1962) supplemented by 2% agar. The plates were incubated at 22±2°C and illuminated with white fluorescent light (120 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), with a 24 h photoperiod. The isolated colonies were streaked on a new plate until monoalgal culture was obtained. To eliminate bacterial contamination, a mixture of antibiotics (Sigma) was used: penicillin, streptomycin and neomycin, in the proportion of 50 mg, 50 mg and 100 mg per liter, respectively.

Morphological and Molecular Identification of *Dunaliella* Strain

The morphology of the isolated *Dunaliella* strain was examined under a light microscope (Leica) by using the software LAS EZ (Leica DM500). The morphological characteristics were studied referring to Browitzka & Siva (2007).

Genomic DNA from *Dunaliella* culture was isolated according to Chelex-100 (Biorad, USA) method (Richlen & Barber, 2005). The Chelex was used at 10%. The DNA extract was purified using Real Clean Spin Kit, RBMCS02, from Real laboratory. Purification was performed according to the manufacturer's instructions.

ITS and rbcL regions were amplified using primers ITS-AB28, ITS-TW81, rbcL-17 and rbcL-18 (Table 1), respectively (Goff, Moon, & Coleman, 1994; Nozaki *et*

Table 1. Primers used for PCR amplification

Amplified genes	Primer	Primer sequences	Annealing temperature (°C)
ITS	ITS-AB28 (F)*	GGGATCCGTTTCCGTAGGTGAACCTGC	69.5
	ITS-TW81(R)*	GGGATCCATATGCTTAAGTTCAGCGGGT	66.6
rbcL	rbcL-17 (F)	ATGGTTCCACCAACAGAAAAC	55.3
	rbcL-18 (R)	TGTGCTTTGTAATAGCTTCAG	54.7

*(F) - forward; (R) - reverse.

al., 1995; Díez, Pedrós-Alió, Marsh, & Massana, 2001). Amplification reactions were performed on a Bio-Rad thermocycler. PCR amplification was carried out in a total volume of 25 µl, containing 19.5 µl H₂O, 1.87 µl PCR buffer, 2 µl dNTPs (2.5 mM of each), 0.125 µl *Taq* polymerase (Takara Extaq Hot Start Version, in 4.5 mM of MgCl₂), 1 µl DNA and 0.25 µl of each primer (25 pM). The PCR conditions were as follows for ITS: 1 cycle of 95°C for 5 min, 35 cycles of 95°C for 1 min, 52°C for 1 min, and 72°C for 1 min, and 1 cycle of final extension at 72°C for 5 min. For *rbcl*, the PCR conditions were: 1 cycle of 95°C for 5 min, 35 cycles of 95°C for 30 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 40 s, and 1 cycle of final extension at 72°C for 5 min.

All PCR products were then checked by 2% agarose gel electrophoresis in 1X TAE buffer (Tris; acetic acid; EDTA), at 100 V, 400 mA, 250 W for 30 min, and the PCR products were checked with a UV illuminator, referring to molecular weight marker (100-2642 bp). An enzymatic method was used to purify the products using Illustra ExoProStar 1-Step from GE Healthcare Life Sciences. Sequencing was performed by MacroGen services, using Sanger's Dideoxy method. The sequences obtained were aligned with others sequences available from GenBank BLAST in the NCBI database, using ClustalW algorithm in MEGA version 6 (Tamura, Stecher, Peterson, Filipiski, & Kumar, 2013). A phylogenetic tree was constructed using neighbor-joining with the Tamura-Nei model. The trees topologies were evaluated by bootstrap analysis using 1000 resamplings. The trees were established using *Chlamydomonas reinhardtii* P.A. Dang. as an outgroup.

Growth Conditions

Two culture media were tested for the growth of *Dunaliella* strain: Johnson medium (Johnson, Johnson, Mac Elroy, Speer, & Bruff, 1968) and f/2 medium (Guillard & Ryther, 1962). These media contain 1 M NaCl. The pH was adjusted at 7.5, and the media were autoclaved at 121°C for 20 min.

Carotenogenesis Process

The carotenogenesis process was carried out in two phases. The first phase (growth phase) consisted of the accumulation of a high level of biomass, with low β-carotenes amounts by culturing the *Dunaliella* strain at optimal conditions. Tests were performed by inoculation of 20 ml of stock culture into 250 ml of f/2

and Johnson's media (1 M NaCl). They were incubated at 22 ± 2°C with continuous illumination given by white lamps (120 µmol photons m⁻² s⁻¹), with injection of a filtrate air through a solid glass tube. When the culture was in a high level of biomass, it was used for carotenogenesis tests.

In the second phase (stress phase for carotenoids production), cultures at the end of the exponential phase were transferred into other media to induce cells for carotenogenesis as follows: media containing 2 M NaCl (salt stress), media without nitrate source (nitrate starvation) and media with 2 M NaCl and without nitrate source (combination of the two stress factors).

Growth and Pigments Measurements

Cells growth was estimated by cells number measured by direct counting using a light microscope with Malassez cell. Chlorophyll *a* (chl *a*), chlorophyll *b* (chl *b*) and total carotenoids (car T) were estimated according to the Wellburn method (Wellburn, 1994), using methanol (100%) as a solvent, according to the equation cited below:

$$\text{Chl } a = 15.65 \times (A666) - 7.34 \times (A653)$$

$$\text{Chl } b = 27.05 \times (A653) - 11.21 \times (A666)$$

$$\text{Car T} = (1000) \times A470 - 2.86 \times \text{Chl } a - 129.2 \times \text{Chl } b / 221$$

A: absorbance

All the data are presented graphically as mean ± standard deviation (n = 3).

Results

Physical and Chemical Characteristics of the Sampled Water

To evaluate the composition of the natural habitat of the genus *Dunaliella*, the physical and chemical characteristics of the water sampled from the studied lake were established (Table 2). pH ranged from 7.2 to 7.5, which is the optimum for the growth of microalgae belonging to the genus *Dunaliella*. This pH range is very close to that obtained by Boutaiba, Hacene, Bidle & Maupin-Furlow (2011), who found the pH of the same lake to be around 7.1 to 7.4. Electrical conductivity was 135.6 mS/cm. The lake has salinity ranging from 300 to

Table 2. Chemical and physical properties of water from Sidi Ameur lake

pH	EC (mS/cm)	Salinity	Ca ⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻
Represented as g per liter (g/L)								
7.2-7.5	135.6	300- 350	0.85	2.75	40.25	0.125	158	24.7

350 g/l. The highest minerals in the water were sodium and chloride, 40.25 and 158.00 g/l, respectively. Sulfate level was 24.7 g/l. Potassium and calcium were the lowest minerals present in the water (0.125 and 0.850 g/l, respectively).

Morphological Characteristics of the Isolated Strain

The isolated microalgal strain was named DunaDz1. Cells exhibited a high degree of variability in size and shape, changing from ovoid to spherical shape with changing growth conditions, as well as different sizes. The strain showed a mobility due to the presence of two flagella. The cell size, length as well as width, were measured from the isolation medium (f/2 medium) containing 1 M NaCl, by averaging different repetitions. Average length and width were 17.2 ± 0.1 and $11.5 \pm 0.3 \mu\text{m}$, respectively. The strain DunaDz1 was assigned morphologically to *Dunaliella* genus referring to Borowitzka & Siva (2007).

Amplification, Sequences Analysis and Phylogenetic Study

ITS and rbcL genes used for DunaDz1 strain were successfully amplified and gave a unique band on the electropherogram (Figure 1).

The obtained sequences were analyzed by BLAST and aligned with other *Dunaliella* sequences from GenBank. Great attention has to be given to the choice of this sequences, since the taxonomy of the green algal *Dunaliella* is often seen as confusing and the names associated with species in culture collections are sometimes suspect (Borowitzka & Siva, 2007).

Phylogenetic analysis of the ITS region (730 bp) showed that the strain DunaDz1 was related to members of the genus *Dunaliella* and showed 98.9% identity (the highest percentage) with *D. salina* CCAP 19/12. Molecular investigation using ITS marker clustered strain DunaDz1 with different strains of *D. salina* (Figure 2).

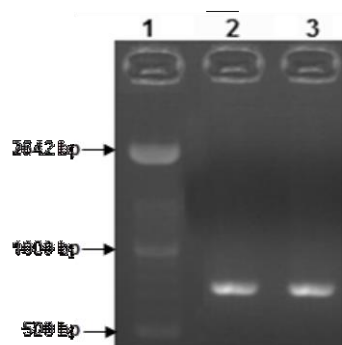


Figure 1. Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from the DNA of DunaDz1 strain. (1) Marker; (2) ITS gene and (3) rbcL gene.

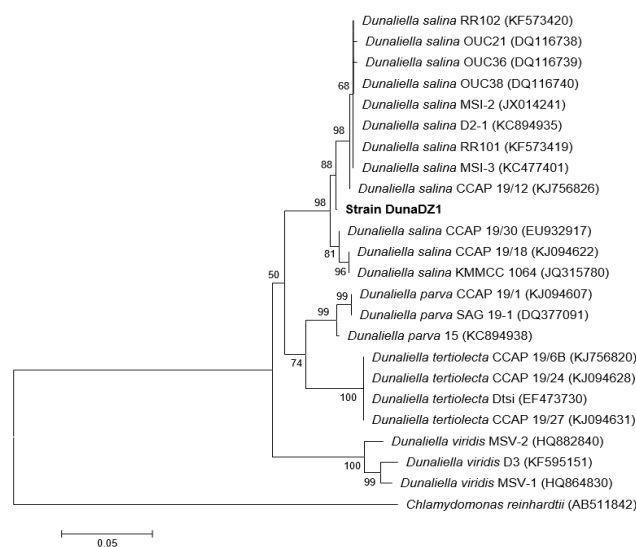


Figure 2. Neighbor-joining tree based on ITS gene sequences showing the position of strain DunaDz1 and its related species of the genus *Dunaliella*. The numbers at the nodes indicate levels of bootstrap support based on a neighbor-joining analysis of 1000 resampled datasets. *Chlamydomonas reinhardtii* was used as an outgroup. Bar, 0.05 substitutions per nucleotide position.

Primers used for *rbcl* produced a sequence of 700 bp. Strain *D. salina* DunaDZ1 was clustered for *rbcl*, as it was for ITS, with other strains of *D. salina* (97.9 to 100% of similarity) (Figure 3).

Carotenogenesis Process Results

Carotenogenesis testing in this study consisted of the investigation of the most appropriate stress factor for carotenoids production by the microalgae *D. salina* strain DunaDZ1. Two stress factors were tested: high salinity 2 M NaCl and nitrate starvation, as well as the combination of these two factors. These tests were conducted as it was described previously, in two phase culture strategy and two cultures media, Johnson and f/2 media.

Growth Phase: Cell Number, Chlorophyll (a, b) and Total Carotenoids

In Johnson medium, the maximum amounts of chlorophylls were $63.63 \pm 0.01 \mu\text{g/ml}$ for chlorophyll *a* and $24.76 \pm 0.13 \mu\text{g/ml}$ for chlorophyll *b*. The maximum cell number of *D. salina* strain DunaDZ1 was found to

be $56.09 \cdot 10^5 \pm 0.8 \text{ cell/ml}$. This level was obtained between 12 and 15 days from the beginning of the tests (Figure 4). However, in f/2 medium, lower levels were found: chlorophyll *a* $21.97 \pm 0.03 \mu\text{g/ml}$, chlorophyll *b* $7.35 \pm 0.8 \mu\text{g/ml}$ and maximum cell number $32.86 \cdot 10^5 \pm 0.9 \text{ cell/ml}$.

Carotenogenesis process in f/2 medium was accelerated, increasing from $13.44 \pm 0.10 \mu\text{g/ml}$ on the 6th day of incubation to $28.58 \pm 0.08 \mu\text{g/ml}$ on the 8th day, to achieve the high amount at the end of the exponential phase. This fact could be explained by nutrients depletion in the medium, since the initial nutrients concentration in f/2 medium was lower compared with Johnson medium. However, in Johnson medium, the carotenoids amount was $22.43 \pm 0.07 \mu\text{g/ml}$ at the end of the growth phase, which corresponds to $4.54 \pm 0.15 \text{ pg/cell}$. The ratio of total carotenoids to chlorophyll remained constant in Johnson medium (~ 0.30), but the ratio increased quickly in f/2 medium from 0.46 at the beginning to 2.11 at the end of the exponential phase (Figure 5). This is due to the high level of total carotenoids in the f/2 medium, because of nutrient depletion.

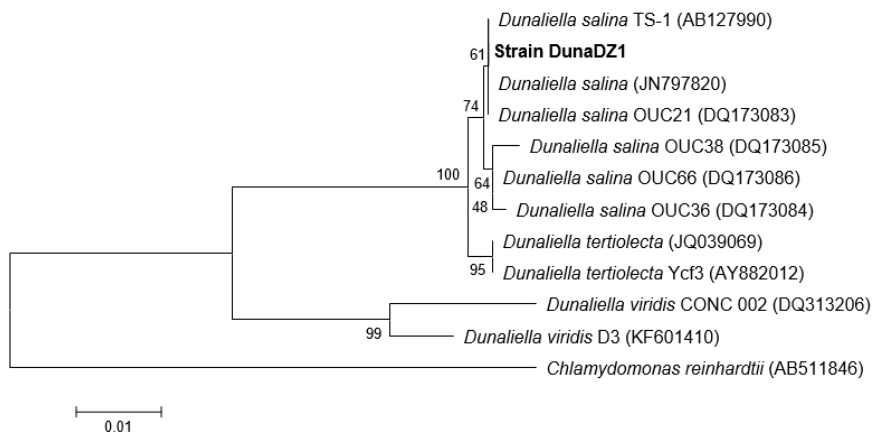


Figure 3. Neighbor-joining tree based on *rbcl* gene sequences showing the position of strain DunaDZ1 and its related species of the genus *Dunaliella*. The numbers at the nodes indicate levels of bootstrap support based on a neighbor-joining analysis of 1000 resampled datasets. *Chlamydomonas reinhardtii* was used as an outgroup. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

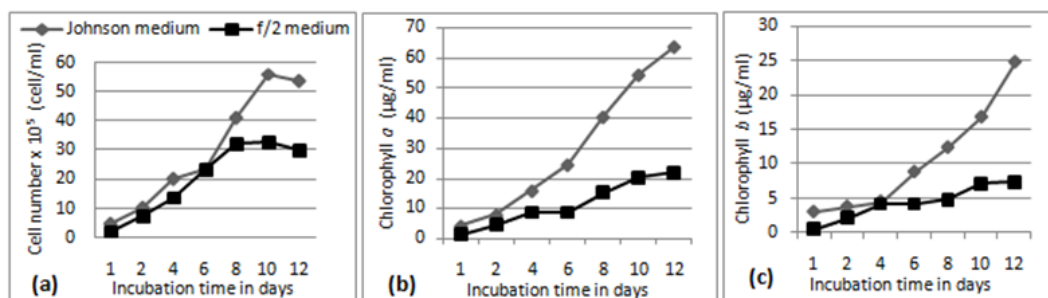


Figure 4. Growth phase and production of chlorophyll by the strain DunaDz1. (a) cell number. (b) chlorophyll *a*. (c) chlorophyll *b*.

Response to High Level of Salinity (NaCl 2 M) during Stress Phase

All stress factors tested led to an increase in carotenoids levels in *D. salina* culture. Induction of carotenoids production in one phase system retards growth and the level of carotenoids is low, that is why the use of two-phase growth strategy lead to a better accumulation of carotenoids (Borowitzka & Borowitzka, 1990).

If we want to induce the production of carotenoids directly by using the stress phase (without going through the growth phase), the growth of *D. salina* will be minimal and the total amount of carotenoids obtained will be low. This shows the need to use the two phases separately (Borowitzka & Borowitzka, 1990).

Cultures in Johnson and f/2 media were incubated at 2 M NaCl. The level of total carotenoids increased reaching 20.12 ± 0.44 and 23.68 ± 0.12 pg/cell, at the 8th day of incubation, for Johnson and f/2 media, respectively (Figure 6). These values were higher than those calculated at the end of the growth phase, which were 4.54 and 12.64 pg/cell, for Johnson and f/2 media, respectively. The effect of high salinity on the

carotenoids accumulation is thus confirmed. Several authors found that high salinity was the best strategy to achieve optimal carotenoids production in the cultures of *D. salina*, with variable carotenoids concentrations: 8.9, 12.21, 12.47 and 15 pg/cell (Kleinegris, Janssen, Brandenburg, & Wijffels, 2010; Wu, Duangmanee, Zhao, Juntawong, & Ma, 2016). This difference might be due to culture conditions and to different *D. salina* strains studied.

Response to Nitrate Starvation during Stress Phase

Accumulation of carotenoids during the stress phase with nitrate starvation was also studied. Cultures about 12 days old were transferred to nitrate-free media. This strategy resulted in an increase in carotenoids amount in f/2 and Johnson media. Within 8 days of incubation in Johnson medium, the level of carotenoids was 16.2 ± 0.24 pg/cell (3-fold increase from the initial value before stress phase). Otherwise, for f/2 medium, carotenoids level increase slightly from 12.64 ± 0.14 pg/cell at the end of the growth phase to 13.21 ± 0.05 pg/cell on the 2nd day of stress, and then decreased until 10.92 ± 0.14 pg/cell (end of test) (Figure 6). This is due to the fact that the cell was

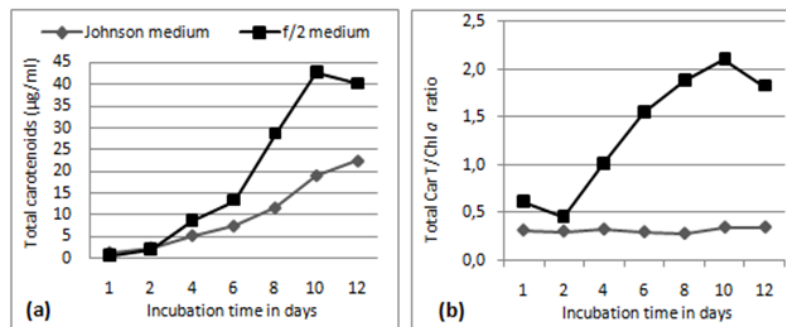


Figure 5. Carotenoids production during growth phase (without stress) by the strain DunaDZ1. (a) total carotenoids. (b) total carotenoids/chlorophyll *a* Ratio.

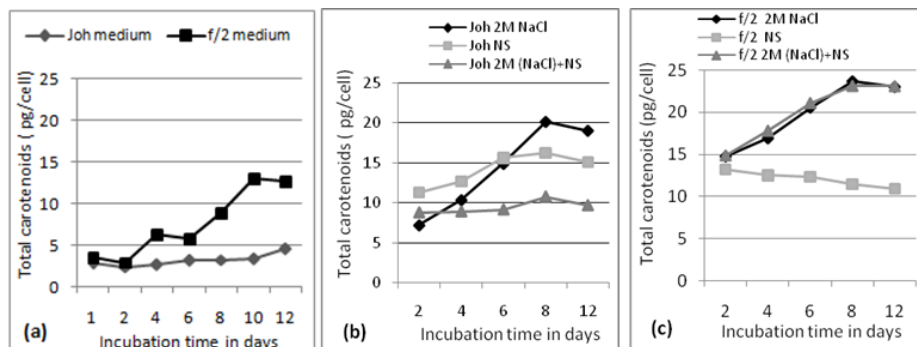


Figure 6. Total carotenoids expressed as pg per cell in the microalgae *D. salina* (DunaDZ1) during growth phase and stress phase. (a) Growth phase (without stress). (b) and (c) effect of various cultivation conditions [2M NaCl; nitrogen starved media (NS) and 2M NaCl + NS media], in Johnson (joh) and f/2 media, respectively. The values are mean of three replicates \pm SD. The stress provoked by 2M NaCl and by nitrogen starvation was applied on the 12th day of growth of the strain DunaDZ1.

already stressed in the first phase by nutrient depletion, and it was subjected to nitrate starvation in the second phase.

According to some authors, a prolonged nutrient starvation leads to a considerable decrease in the growth of the microalgae, and also to a reduction in the production of carotenoids (Borowitzka & Borowitzka, 1988; Hosseini Tafreshi & Shariati, 2009).

Based upon it, the medium composition plays a great role in microalgal growth (Morowvat & Ghasemi, 2016), and subsequently affects carotenoids production. In this present study, the starvation strategy is more effective in Johnson than f/2 medium.

Response to High Level of Salinity Combined with Nitrate Starvation during the Stress Phase

High salinity (2 M) in combination with nitrate starvation also led to an increase in carotenoids concentration in Johnson medium, with lower values compared with each stress factor separately (10.76 ± 0.25 pg/cell after 8 days of incubation). The concentration increased 2 folds in Johnson medium. However, for f/2 medium the combination of salt and nitrate starvation stress gave very close carotenoids values (23.15 ± 0.23 pg/cell) compared with *D. salina* in culture with only salt stress (23.68 ± 0.12 pg/cell, on the 8th day) (Figure 6).

Discussion

The strain DunaDZ1 has different cell shapes, varies from ovoid to spherical, depending on culture conditions. This is in agreement with previous studies, which demonstrated that cells shape of *D. salina* turn to spherical in extreme conditions (Hosseinzadeh Gharajeh, Hejazi, Nazeri, & Barzegari, 2012; Preetha *et al.*, 2012).

The amplification of the ITS and rbcL genes confirmed that the strain DunaDZ1 belongs to the species *D. salina*, which present a great interest regarding β -carotenes production, pigments highly sought by industry. Carotenoids content increased in strain DunaDz1 cells upon salt stress, nitrate starvation treatment and high salinity in combination with nitrogen starvation. In comparison, salt stress was the more effective stress factor on carotenoids level in f/2 and Johnson media.

Several authors tested different stress factors to maximize the production of carotenoids in *D. salina*. Hexin *et al.* (2016) found that nutrient deprivation was a mild stress in comparison to high salt concentration. This finding is confirmed in this study. Some authors recommend that adjusting light and salinity is likely one of the best strategies to achieve optimal carotenoids production in mass cultures of *D. salina* (Marín, Morales, Lodeiros, & Tamigneaux, 1998). In contrast, other authors have found that salinity does not have a

clear effect on β -carotene accumulation per cell (Gomez, Barriga, Cifuentes, & Gonzalez, 2003).

The combination of two stress factors (nitrate starvation and high salinity) leads to results very close to those obtained by salt stress in f/2 medium. Otherwise, for Johnson medium, results obtained by the combination of the two stress factors were lower than those obtained by each factor separately. This fact could be explained by osmotic shock resulting from the accumulation of the two stress factors, which can lead to cell mortality, as well as the carotenoids level decrease.

The highest carotenoid amount (23.68 ± 0.12 pg/cell) was obtained in f/2 medium with high salinity. The values obtained in this study are higher than those reported by (Nikookar, Moradshahi, & Kharati, 2004) and (Fazeli, Tofighi, Samadi, Jamalifar, & Fazeli, 2006) who found amounts of 6.9 and 5.50 pg/cell of carotenoids, respectively, when *D. salina* was cultivated at the salinity of 2M. Otherwise, for the same stress conditions and for different *D. salina* strains, Cifuentes, González, Conejeros, Dellarossa & Parra, 1992 found amount of carotenoids ranging from 4.1 to 27.6 pg/cell.

These results indicated clearly that the amount of carotenoids produced by *D. salina* is highly dependent on the stress factor applied, as well as on the strain studied. It remains difficult to compare results of different studies, mainly due to the fact that various stress factors have been applied and different *D. salina* strains were used, and also, on whether the stress was applied at the beginning of test (lead to low carotenoids amount) or if the two phases strategy was utilized. All these factors should be considered when comparing results.

The intrinsic response of each strain to each inductive factor and to the complex interactions among various environmental conditions demonstrated that there is no predictable unique condition for reaching the maximum carotenoids (Hosseini Tafreshi & Shariati, 2009). Carotenogenesis varied not only according to culture media composition and environmental conditions such as light, but also varied with *D. salina* strains.

As a conclusion, the strain DunaDZ1 isolated from Sidi Ameer lake in Algeria, was assigned to the species *D. salina*, based on morphological and the molecular characteristics. The carotenogenesis tests performed demonstrated that culture of *D. salina* DunaDZ1, under a two stage strategy and under salt stress, produced elevated levels of total carotenoids in Johnson and f/2 media. The combination of two stress factors (nitrate deprivation and high salinity) did not lead to the higher total carotenoids level for Johnson medium. The carotenogenesis process is highly depends on medium composition. f/2 medium can be selected for the culture of *D. salina* as it has low cost compared with Johnson medium since it is made with sea water.

References

- Ben-Amotz, A. (1995). New mode of *Dunaliella* biotechnology: two-phase growth for β -carotene production. *Journal of Applied Phycology*, 7(1), 65-68. <http://doi.org/10.1007/BF00003552>
- Borowitzka, M., & Borowitzka, L. (1988). Limits to growth and carotenogenesis in laboratory and large-scale outdoor cultures of *Dunaliella salina*. In T. Stadler, J. Mollion, M.C. Verdu, Y. Karamanos, H. Morvan, & D. Christiaen (Eds.), *Algal Biotechnology* (pp. 371-381). Essex, UK, Elsevier Applied Science, 533 pp.
- Borowitzka, M., & Siva, C. (2007). The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. *Journal of Applied Phycology*, 19(5), 567-590. <http://doi.org/10.1007/s10811-007-9171-x>
- Borowitzka, M.A., & Borowitzka, L.J. (1990). Commercial production of β -carotene by *Dunaliella salina* in open ponds. *Bulletin of Marine Science*, 47(1), 244-252.
- Boutaiba, S., Hacene, H., Bidle, K.A., & Maupin-Furlow, J.A. (2011). Microbial diversity of the hypersaline Sidi Ameur and Himatlatt salt lakes of the Algerian Sahara. *Journal of Arid Environments*, 75(10), 909-916. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaridenv.2011.04.010>
- Buchheim, M.A., Kirkwood, A.E., Buchheim, J.A., Verghese, B., & Henley, W.J. (2010). Hypersaline soil supports a diverse community of *Dunaliella* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, 46(5), 1038-1047. <http://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00886.x>
- Cifuentes, A.S., González, M., Conejeros, M., Dellarossa, V., & Parra, O. (1992). Growth and carotenogenesis in eight strains of *Dunaliella salina* Teodoresco from Chile. *Journal of Applied Phycology*, 4(2), 111-118. <http://doi.org/10.1007/BF02442459>
- Coleman, A., Suarez, A., & Goff, L.J. (1994). Molecular delineation of species and syngens in volvocacean green algae (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 30(1), 80-90. <http://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1994.00080.x>
- Díez, B., Pedrós-Alió, A.C., Marsh, T.L., & Massana, R. (2001). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 2942-2951. <http://doi.org/10.1128/AEM.67.7.2942-2951.2001>
- Fazeli, M.R., Tofighi, H., Samadi, N., Jamalifar, H., & Fazeli, A. (2006). Carotenoids accumulation by *Dunaliella tertiolecta* (Lake Urmia isolate) and *Dunaliella salina* (CCAP 19/18 & wt) under stress conditions. *Daru Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(3), 146-150.
- Goff, L.J., Moon, D.A., & Coleman, A.W. (1994). Molecular delineation of species and species relationships in the red algal agarophytes *Gracilariopsis* and *Gracilaria* (Gracilariiales). *Journal of Phycology*, 30(3), 521-537. <http://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1994.00521.x>
- Gomez, P.I., Barriga, A., Cifuentes, A.S., & Gonzalez, M.A. (2003). Effect of salinity on the quantity and quality of carotenoids accumulated by *Dunaliella salina* (strain CONC-007) and *Dunaliella bardawil* (strain ATCC 30861) Chlorophyta. *Biological Research*, 36(2), 185-192. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-97602003000200008>
- González, M.A., Coleman, A.W., Gómez, P.I., & Montoya, R. (2001). Phylogenetic relationship among various strains of *Dunaliella* (Chlorophyceae) based on nuclear ITS rDNA sequences. *Journal of Phycology*, 37(4), 604-611. <http://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2001.037004604.x>
- Guillard, R.R., & Ryther, J.H. (1962). Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nanta* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*, 8, 229-239. <http://doi.org/10.1139/m62-029>
- Hejazi, M.A., Barzegari, A., Gharajeh, N.H., & Hejazi, M.S. (2010). Introduction of a novel 18S rDNA gene arrangement along with distinct ITS region in the saline water microalga *Dunaliella*. *Saline Systems*, 6(1), 4. <http://doi.org/10.1186/1746-1448-6-4>
- Hexin, L., Xianggan, C., Fazli, W., Feng, X., Cheng, Z., & Shiru, J. (2016). Analysis of the physiological and molecular responses of *Dunaliella salina* to acronutrient deprivation. *PLOS ONE*, 11(3), e0152226. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0152226.g005>
- Hosseini Tafreshi, A., & Shariati, M. (2009). *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. *Journal of Applied Microbiology*, 107(1), 14-35. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04153.x>
- Hosseinzadeh Gharajeh, N., Hejazi, M.A., Nazeri, S., & Barzegari, A. (2012). Characterization of an indigenous isolate, *Dunaliella tertiolecta* ABRIINW-G3, from Gavkhooni salt marsh in Iran based on molecular and some morpho-physiological attributes. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 14 (Supplementary Issue), 1579-1590.
- ISO 22743. (2006). Qualité de l'eau - Dosage des sulfates - Méthode par analyse en flux continu (CFA).
- Johnson, M.K., Johnson, E.J., Mac Elroy, R.D., Speer, H.L., & Bruff, B.S. (1968). Effects of salts on the halophilic alga *Dunaliella viridis*. *Journal of Bacteriology*, 95, 1461-1468.
- Kim, M., Ahn, J., Jeon, H., & Jin, E. (2017). Development of a *Dunaliella tertiolecta* strain with increased zeaxanthin content using random mutagenesis. *Marine Drugs*, 15(6), 189. <http://doi.org/10.3390/md15060189>
- Kleinegris, D.M.M., Janssen, M., Brandenburg, W.A., & Wijffels, R.H. (2010). The Selectivity of milking of *Dunaliella salina*. *Marine Biotechnology*, 12(1), 14-23. <http://doi.org/10.1007/s10126-009-9195-0>
- Marín, N., Morales, F., Lodeiros, C., & Tamineaux, E. (1998). Effect of nitrate concentration on growth and pigment synthesis of *Dunaliella salina* cultivated under low illumination and preadapted to different salinities. *Journal of Applied Phycology*, 10(4), 405-411. <http://doi.org/10.1023/A:1008017928651>
- Morowvat, M.H., & Ghasemi, Y. (2016). Culture medium optimization for enhanced β -carotene and biomass production by *Dunaliella salina* in mixotrophic culture. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7, 217-223. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbac.2016.06.008>
- Nikookar, K., Moradshahi, A., & Kharati, M. (2004). Influence of salinity on the growth, pigmentation and ascorbate peroxidase activity of *Dunaliella salina* isolated from Maharlu salt lake in Shiraz. *Iranian Journal of Science and Technology (Sciences)*, 28(1), 117-125. <http://dx.doi.org/10.22099/IJSTS.2004.2840>
- Nozaki, H., Itoh, M., Sano, R., Uchida, H., Watanabe, M.M., &

- Kuroiwa, T. (1995). Phylogenetic relationships within the colonial volvocales (*Chlorophyta*) inferred from rbcL gene sequence data. *Journal of Phycology*, 31(6), 970-979. <http://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1995.00970.x>
- Olmos Soto, J. (2015). *Dunaliella* identification using DNA fingerprinting intron-sizing method and species-specific oligonucleotides: new insights on *Dunaliella* molecular identification. In S.K. Kim (Ed.), *Handbook of Marine Microalgae* (pp. 559-568). Academic Press, 604 pp.
- Preetha, K., John, L., Subin, C.S., & Vijayan, K.K. (2012). Phenotypic and genetic characterization of *Dunaliella* (*Chlorophyta*) from Indian salinas and their diversity. *Aquatic Biosystems*, 8(1), 27. <http://doi.org/10.1186/2046-9063-8-27>
- Richlen, M.L., & Barber, P.H. (2005). A technique for the rapid extraction of microalgal DNA from single live and preserved cells. *Molecular Ecology Notes*, 5(3), 688-691. <http://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01032.x>
- Shaker, S., Morowvat, M.H., & Ghasemi, Y. (2017). Effects of sulfur, iron and manganese starvation on growth, β -carotene production and lipid profile of *Dunaliella salina*. *Journal of Young Pharmacists*, 9(1), 43-46. <http://doi.org/10.5530/jyp.2017.9.9>
- Shariati, M., & Hadi, M.R. (2011). Progress in molecular and environmental bioengineering: from analysis and modeling to technology applications. In A. Carpi (Ed.), *Microalgal biotechnology and bioenergy in Dunaliella* (pp. 483-506). London, UK, Intech Open Access Publisher, 646 pp. <http://doi.org/10.5772/771>
- Subramaniyan, V., Munuswamy, S., Chinnasamy, S., Sailendra, B., & Ramasamy, R. (2013). Culturing marine green microalgae *Dunaliella salina* Teod. and *Dunaliella tertiolecta* Masjuk in Dewalne's medium for valuable feeds stock. *Journal of Modern Biotechnology*, 2(2), 40-45.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729. <http://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Wellburn, A.R. (1994). The spectral determination of chlorophyll a and chlorophyll b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144(3), 307-313. [http://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](http://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)
- Wu, Z., Duangmanee, P., Zhao, P., Juntawong, N., & Ma, C. (2016). The effects of light, temperature, and nutrition on growth and pigment accumulation of three *Dunaliella salina* strains isolated from saline soil. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 9(1), e26732. <http://doi.org/10.5812/jjm.26732>
- Xu, Y., Ibrahim, I.M., & Harvey, P.J. (2016). The influence of photoperiod and light intensity on the growth and photosynthesis of *Dunaliella salina* (*Chlorophyta*) CCAP 19/30. *Plant Physiology and Biochemistry*, 106, 305-315. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.05.021>

ISOLATION AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF TWO STRAINS OF MICROALGAE FROM SIDI AMEUR SALT LAKE IN ALGERIA

YAICHE ACHOUR Hafsa^{1*}, DOUMANDJI Amel², BOURAS Noureddine^{3,4},
SABAOU Nasserline⁴, ASSUNÇÃO Patricia⁵

⁽¹⁾Laboratoire de Recherche de Biotechnologie des Productions Végétales,
Département de Biotechnologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Université de Blida 1, 09000, Blida, Algérie

⁽²⁾Laboratoire de Recherche de Biotechnologie des Productions Végétales
Département Agroalimentaire, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Université de Blida 1, 09000, Blida, Algérie

⁽³⁾Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre,
Université de Ghardaïa, 47000, Ghardaïa, Algérie

⁽⁴⁾Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM),
Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger, Algérie

⁽⁵⁾Instituto Tecnológico de Canarias (ITC), Departamento de Biotecnología, División de
Investigación y Desarrollo Tecnológico, Pozo Izquierdo, 35119, Sta. Lucía, Canary Islands, Spain
E-mail: hafsa_yah@hotmail.fr

(Received 11 April 2018 - Accepted 05 June 2018)

Abstract.- Microalgae constitute an excellent feedstock of valuable compounds which have varied applications in the nutraceutical and pharmaceutical industries. In this study, the isolation of two microalgal strains, DunaDZ₂ and DunaDZ₃, from Sidi Ameur salt lake was done by streaking water on solid f/2 medium. The strains were subjected to morphological identification as well as molecular identification by sequencing genes ITS and rbcL. The strain DunaDZ₂ presented a palmella stage (colonial aggregates of cells) throughout all of its life cycle (length $5.5 \pm 1.8 \mu\text{m}$ and width $4.8 \pm 1.2 \mu\text{m}$). By contrast, DunaDZ₃ presented ellipsoid shape of about $14.6 \pm 1.7 \mu\text{m}$ length and $6.9 \pm 1.3 \mu\text{m}$ width. Phylogenetic analysis based on ITS and rbcL genes revealed that both strains are members of the genus *Dunaliella*, and were grouped in the same clade with different strains of *Dunaliella viridis* (96.9 to 98.7% of similarity for ITS gene, and 96.4 to 98.1% for rbcL gene). The species *Dunaliella viridis* is considered as promising feedstock for applications in the production of biofuels and as a nutritive food source for aquatic organisms.

Key words: *Dunaliella*, isolation, salt lake, ITS, rbcL.

ISOLEMENT ET IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE DE DEUX SOUCHES DE MICROALGUES PROVENANT DU LAC SALÉ DE SIDI AMEUR EN ALGÉRIE

Résumé.- Les microalgues représentent une excellente source de molécules qui sont valorisables dans l'industrie nutraceutique et pharmaceutique. Dans cette étude, l'isolement de deux souches de microalgues, Duna DZ₂ et Duna DZ₃, à partir du lac salé de Sidi Ameur a été réalisé par stries sur le milieu solide f/2. Les souches ont fait l'objet d'une identification morphologique et moléculaire par l'amplification de deux gènes, ITS et rbcL. La souche DunaDZ₂ se présente au stade de «Palmella» (agrégat de cellules formant des colonies) tout au long de son cycle de vie. Les dimensions des cellules sont de $5,5 \pm 1,8 \mu\text{m}$ pour la longueur et $4,8 \pm 1,2 \mu\text{m}$ pour la largeur. En revanche, la souche DunaDZ₃ possède une forme ellipsoïde, dont la longueur est de l'ordre de $14,6 \pm 1,7 \mu\text{m}$ et la largeur de $6,9 \pm 1,3 \mu\text{m}$. L'analyse phylogénétique des gènes amplifiés ITS et rbcL a permis de rattacher les deux souches au genre *Dunaliella*. Ces souches sont groupées dans le même clade que les souches *Dunaliella viridis* (96,9 à 98,7% de similarité pour le gène ITS, et 96,4 à 98,1% pour le gène rbcL). L'espèce *D. viridis* est considérée comme une espèce prometteuse pour la production de biofuel et comme un aliment nutritif pour les organismes aquatiques.

Mots clés: *Dunaliella*, isolement, lac salé, ITS, rbcL.

Introduction

Microalgae are photosynthetic unicellular organisms, which have the ability to grow rapidly. They use light energy and fix atmospheric CO₂. The wide diversity of compounds synthesized from different metabolic pathways of fresh and marine water algae provide promising sources which can support human health, as fatty acids, steroids, carotenoids, polysaccharides and lecithin [1,2]. These compounds could be used in food, pharmaceutical, and cosmetic industries, thanks to their numerous biological activities (antioxidant, anticancer, antihypertension, immunomodulatory and prevention of cardiovascular diseases) [3].

Microalgae are ubiquitous organisms. They are found worldwide and in many different environments. They can be found in fresh water (ponds, canals and lakes), as well as in marine and hyper-saline environments [4]. Ephemeral salt lakes, called Sebkhass or Chotts, are closed depressions which are periodically flooded. The depth can range from 20 cm to 4 m. During summer, salt lakes dry up and are covered with a salt crust. Sebkhass are common in Algeria, and they are located mainly in the North and the East of the country. The main salt lakes in Algeria are chott Merouane, sebkha of Arzew, sebkha of Oran, sebkha of Sidi Bouziane, chott Zahrez Gharbi and Sidi Ameur lake [5]. These salt lakes should be investigated to estimate their microalgal biodiversity.

In this study, two strains of microalgae were isolated from Sidi Ameur salt lake. The strains were described on the basis of their morphological characteristics and molecular identification, by amplification of ITS (Internal Transcribed Spacer) and rbcL (ribulose-bisphosphate carboxylase) genes.

1.- Material and methods

1.1.- Isolation, purification and morphological identification of the microalgal strains

The strains of microalgae were isolated from saline water, collected from Sidi Ameur salt lake (latitude 35°27' North, longitude 3°68' East), Djelfa province, Algeria (fig. 1).

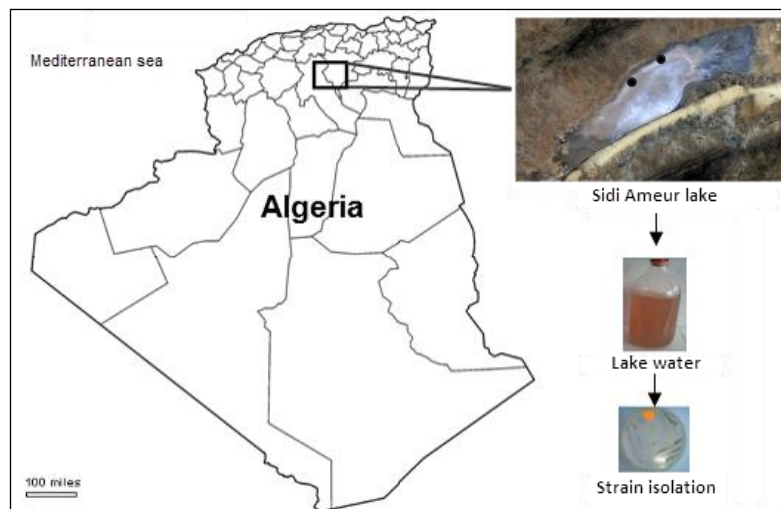


Figure 1.- Site description and geographic location of Sidi Ameur lake.
The marked parts (•) are the sample collection sites

Strains were isolated by spreading water samples on f/2 medium plates. Then plates were incubated at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and illuminated with white fluorescent light ($120 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), with a 24 h photoperiod. The f/2 medium [6] contains the following nutrients: 1M NaCl; $8.82 \cdot 10^{-4}$ M NaNO_3 ; $3.62 \cdot 10^{-5}$ M KH_2PO_4 ; $1.17 \cdot 10^{-5}$ M $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $1.17 \cdot 10^{-5}$ M $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $3.93 \cdot 10^{-8}$ M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $2.60 \cdot 10^{-8}$ M $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $7.65 \cdot 10^{-8}$ M $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $4.20 \cdot 10^{-8}$ M $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $9.19 \cdot 10^{-7}$ M $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 2% agar. The pH was adjusted to 7.5. Colonies were picked up and streaked in a new plate.

The morphology of the isolated strains was studied using a light microscope (Leica). The software LAS EZ (Leica DM500) was used to estimate cell size (length and width). This measurement was done in f/2 liquid medium containing 1 M NaCl, by averaging different repetitions.

1.2.- Molecular identification of the microalgal strains

1.2.1.- DNA extraction

DNA extraction was performed according to chelex-100 method [7]. Colonies from solid medium (monoalgal culture) were suspended in 300 μl of 10% chelex resin. The suspension was vortexed for 10 to 15 s, then incubated at 95°C for 30 min. The supernatant which contain DNA was recovered by centrifugation for 5 min at 10,000 g.

1.2.2.- PCR amplification and sequencing

ITS and *rbcL* regions were amplified using primers ITS-AB28 (5'-GGGATCCGTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3'), ITS-TW81 (5'-GGGATCCATATGCTTAA GTTCAGCGGGT-3'), *rbcL*-17 (5'-ATGGTTCCACCAACAGAAAAC-3') and *rbcL*-18 (5'-TGTGCTTTGTAAATAGCTTCAG-3'), respectively [8, 9].

Amplification reactions were performed on a Bio-Rad thermocycler. PCR amplification was carried out in a total volume of 25 μl , containing 19.5 μl H_2O , 1.87 μl PCR buffer, 2 μl dNTPs (2.5 mM of each), 0.125 μl *Taq* polymerase (Takara Extaq Hot Start Version, in 4.5 mM of MgCl_2), 1 μl DNA and 0.25 μl of each primer (25 pM).

The PCR conditions were as follow for ITS: 1 cycle at 95°C for 5 min, 35 cycles at 52°C for 1 min and 72°C for 1 min. The PCR conditions for *rbcL* were: 1 cycle of 95°C for 5 min, 35 cycles of 95°C for 30 s, 55°C for 30 s, 72°C for 40 s and 1 cycle of final extension at 72°C for 5 min. PCR products were examined on 1% agarose gel and were purified using Illustra ExoProStar 1-Step from GE Healthcare Life Sciences. Sequencing was performed by Macrogen services, using Sanger's Dideoxy method.

1.2.3.- Phylogenetic analysis

The obtained sequences were aligned with others sequences available from GenBank BLAST in the NCBI database, using ClustalW algorithm in MEGA version 6 [10]. The phylogenetic tree was generated using Tamura-Nei distance parameters and the neighbor-joining (NJ) method. NJ bootstrapping was performed with 1000 resampling events. The tree was established using *Chlamydomonas reinhardtii* as an outgroup.

2.- Results and discussion

2.1.- Morphological characteristics

In this study, two strains, named DunaDZ₂ and DunaDZ₃, were isolated. The morphological characteristics of these strains were studied during exponential phase, from f/2 medium with 1 M NaCl.

For the strain DunaDZ₂, the cells are round, non motile and grouped together (aggregate) within a mucilaginous matrix. This stage is called palmella forms (fig. 2a). Average length and width were about 5.5 ± 1.8 and 4.8 ± 1.2 μm , respectively. The unicellular algae can develop palmella forms in their life cycle, when exposed to various extreme environment conditions, such as salinity [11] and oxidative stress [12]. According to Borowitzka and Siva [13], this stage could be caused also by a reduced salinity, less than 10% NaCl. When the salinity is around 20% cells reform their flagella and return to the motile stage. Several authors have noticed this changing in shape and behaviors for the microalgae *Euglena*, *Chlamydomonas*, *Dunaliella* and *Pediastrum* [14, 15]. Nutrient deficiency and low temperature may also trigger the formation of these palmelloid forms [13].

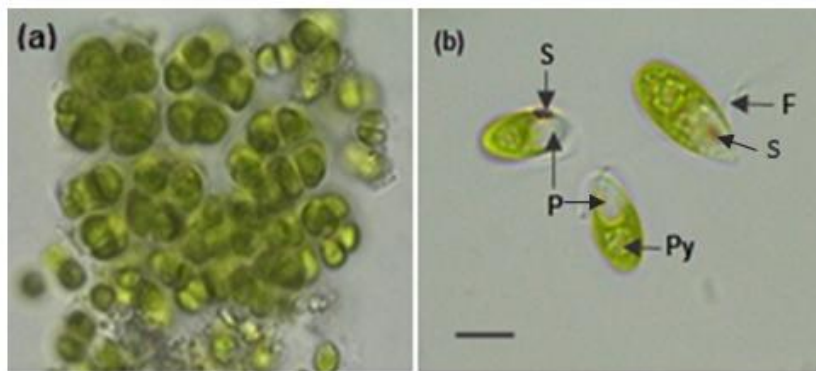


Figure 2.- Microscopic view of the isolated *Dunaliella* strains, grown on f/2 medium at 1 M NaCl.

(a) DunaDZ₂ at palmella stage (aggregate of cells on mucilaginous matrix).

(b) DunaDZ₃: ellipsoid cells with chloroplast containing pyrenoid (Py), stigma (S), flagella (F) and Papilla (P). Bar, 10 μm .

However, the strain DunaDZ₃ presented an ellipsoid shape, with one large red stigma elongated at the apical end of cell (fig. 2b). Cells are motile with two equal flagella. Cell size was 14.6 ± 1.7 μm and 6.9 ± 1.3 μm for length and width, respectively.

Based on the morphological characteristics, the isolated strains were assigned to the genus *Dunaliella*. When the strains DunaDZ₂ and DunaDZ₃ were subjected to stress factors, by nitrate starvation and high light, they remain green, which means that they do not have the ability to produce carotenoids. Only the species *D. salina* and *D. parva* were reported in the literature as carotenogenic species.

2.2.- Amplification and sequencing results

Based on sequences obtained by amplification of ITS and *rbcL* genes, the strains DunaDZ₂ and DunaDZ₃ were assigned to the genus *Dunaliella*. Amplification of ITS gene gave products of 732 bp for DunaDZ₂ and 761 bp for DunaDZ₃, respectively. While the

products obtained for *rbcL* gene were 866 bp for DunaDZ₂ and 966 bp for DunaDZ₃.

Alignment of ITS sequences obtained for both strains with those from the NCBI database, revealed that strains DunaDZ₂ and DunaDZ₃ grouped with different strains of *Dunaliella viridis*. A phylogenetic tree was established and is shown in figure 3. The strain DunaDZ₂ showed 96.9% identity with *D. viridis* NIOT-95. Strain DunaDZ₃ showed 98.7% of similarity with *D. viridis* MSV-1. When the sequences of the isolated strains were aligned together, they showed identity of 95.3%.

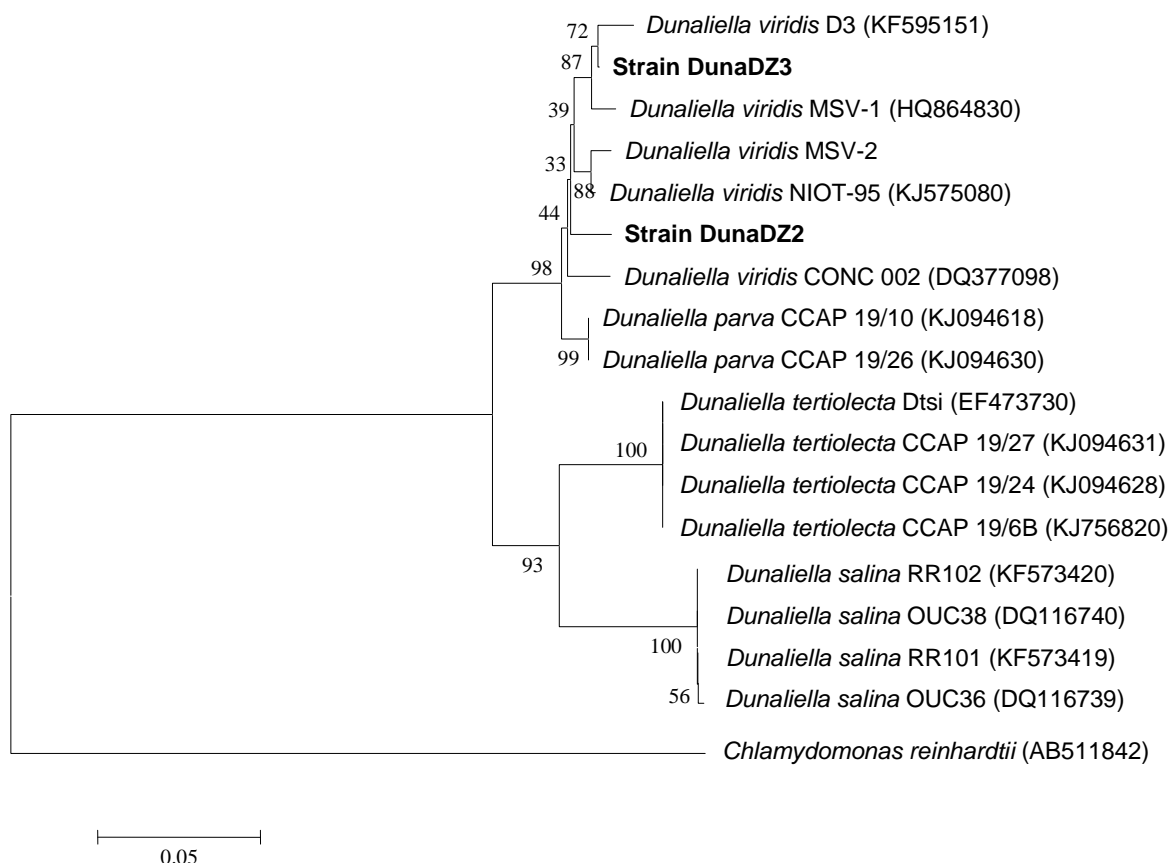


Figure 3.- Neighbor-joining tree based on ITS gene sequences showing the position of strains DunaDZ₂ and DunaDZ₃, and its related species of the genus *Dunaliella*. The numbers at the nodes indicate levels of bootstrap support based on a neighbor-joining analysis of 1000 resampled datasets; *Bar*, 0.05.

Results obtained from the amplification of the *rbcL* gene showed that strains DunaDZ₂ and DunaDZ₃ belong to the genus *Dunaliella*, and presented 96.4% and 98.1% of similarity, with *D. viridis* strain CONC002 and *D. viridis* strain D3, respectively (fig. 4).

Dunaliella viridis is a halotolerant green unicellular microalgae, that belong to the phylum *Chlorophyta*. It grows optimally at 60-90 g/l NaCl [13].

This species generates a great interest, by its role in the environment as well as its capacity to produce bioactive compounds under stress conditions. *Dunaliella viridis* can accumulate significant amounts of valuable lipids (15-45%), which can be exploited for the production of biofuel. It also contains proteins (up to 32%) and carbohydrates (up to 8%) [16]. This species has properties that make it a potential candidate for mass culture on a

commercial scale. It has a high growth rate and is much more productive than the other *Dunaliella* species. *D. viridis* could be exploited as nutritive food source for aquatic organisms [17]. It will be very interesting to study, in the future, the characteristics of the strains DunaDZ₂ and DunaDZ₃, and to promote the microalgae *Dunaliella*, especially those present in the Algerian salt lakes. It will be important to focus attention on other *Dunaliella* species, such as *D. salina*, known in the literature as a natural producer of β-carotenes.

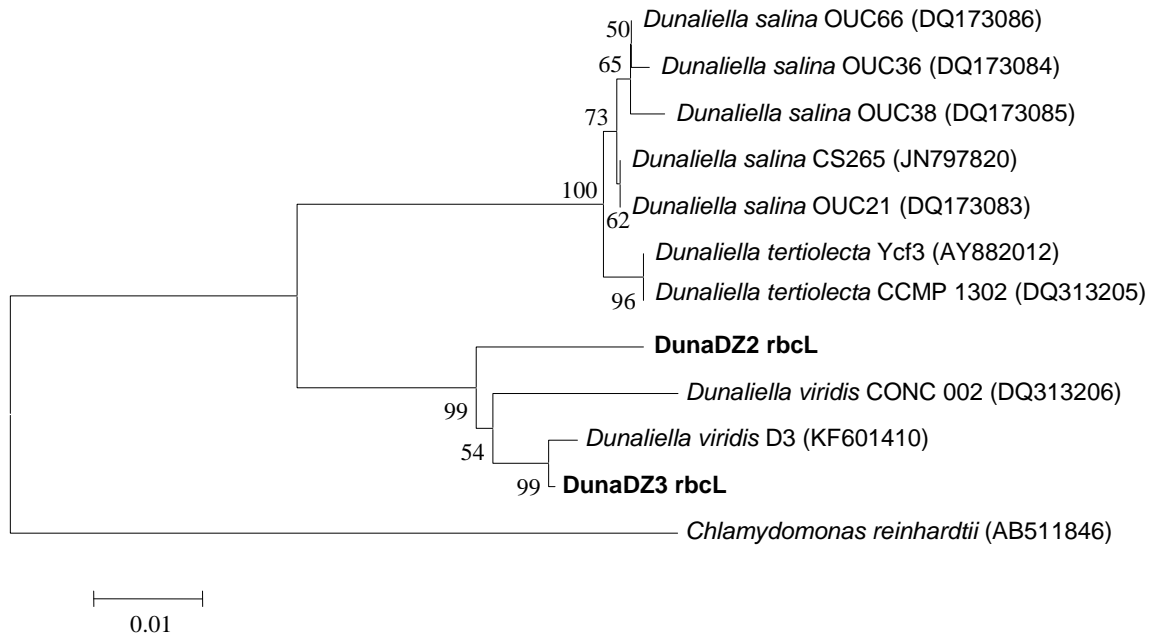


Figure 4.- Neighbor-joining tree based on rbcL gene sequences showing the position of strains DunaDZ₂ and DunaDZ₃, and its related species of the genus *Dunaliella*. The numbers at the nodes indicate levels of bootstrap support based on a neighbor-joining analysis of 1000 resampled datasets. Bar, 0.01.

References

- [1].- García J. L., Vicente M., Galán B., 2017.- Microalgae, old sustainable food and fashion nutraceuticals. *Microbial Biotechnology*, 10: 1017–1024.
- [2].- Sathasivam R., Radhakrishnan R., Hashem A., Abd Allah E. F., 2017.- Microalgae metabolites: a rich source for food and medicine. *Saudi Journal of Biological Sciences*, (in press).
- [3].- Hamed I., 2016.- The evolution and versatility of microalgal biotechnology: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15: 1104–1123.
- [4].- Williams P. J. L. B., Laurens L. M., 2010.- Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. *Energy & Environmental Science*, 3: 554–590.
- [5].- Demnati F., Samraoui B., Allache F., Sandoz A., Ernoul L., 2017.- A literature review of Algerian salt lakes: values, threats and implications. *Environmental Earth Sciences*, 76: 127.
- [6].- Guillard R. R., Ryther J. H., 1962.- Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nanta* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian*

Journal of Microbiology, 8: 229–239.

- [7].- Singer-Sam J., Tanguay R. L., Riggs A. D., 1989.- Use of chelex to improve the PCR signal from a small number of cells. *Amplifications*, 3: 11 p.
- [8].- Goff L. J., Moon D. A., Coleman A. W., 1994.- Molecular delineation of species and species relationships in the red algal *Agarophytes gracilariopsis* and *Gracilaria* (*Gracilariales*). *Journal of Phycology*, 30: 521–537.
- [9].- Nozaki H., Itoh M., Sano R., Uchida H., Watanabe M. M., Kuroiwa T., 1995.- Phylogenetic relationships within the colonial *Volvocales* (*Chlorophyta*) inferred from rbcL gene sequence data. *Journal of Phycology*, 31: 970–979.
- [10].- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipinski A., Kumar S., 2013.- MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725–2729.
- [11].- Takouridis S. J., Tribe D. E., Gras S. L., Martin G. J., 2015.- The selective breeding of the freshwater microalga *Chlamydomonas reinhardtii* for growth in salinity. *Bioresource Technology*, 184: 18–22.
- [12].- Wang S. B., Chen F., Sommerfeld M., Hu Q., 2004.- Proteomic analysis of molecular response to oxidative stress by the green alga *Haematococcus pluvialis* (*Chlorophyceae*). *Planta*, 220: 17–29.
- [13].- Borowitzka M., 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.
- [14].- Sztrum A. A., Sabatini S. E., Rodríguez M. C., 2012.- Isocitrate lyase activity and antioxidant responses in copper-stressed cultures of *Chlamydomonas reinhardtii* (*Volvocales*, *Chlorophyceae*). *Phycologia*, 51: 135–143.
- [15].- Lurling M., Beekman W., 2006.- Palmelloids formation in *Chlamydomonas reinhardtii*: defence against rotifer predators. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, 42: 65–72.
- [16].- Ben-Amotz A., Avron M., 1990.- The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella*. *Trends in Biotechnology*, 8: 121–126.
- [17].- Guedes A. C., Malcata F. X., 2012.- Nutritional value and uses of microalgae in aquaculture. In *Aquaculture*, inTech, 60–78.