



**Ministère de L'Enseignement Supérieur Et de la Recherche  
Scientifique**

**Université Larbi Ben M'hidi Oum El Bouaghi**

**Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie**

**Département des sciences de la nature et de la vie**



N°d'ordre:.....

N°de série:.....

## **Thèse**

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT 3<sup>ème</sup> cycle

**Filière** : Biotechnologie

**Option** : Biotechnologie Microbienne

## **Thème**

**Modulation de l'activité des enzymes antioxydants pour l'augmentation  
de la production des caroténoïdes à partir de microalgues**

Présentée Par : **BOUZIDI Nour El Aimane**

Soutenue le : 13 /07/2023

### **Devant le jury composé de :**

Président	<b>Pr. ARHAB Rabah</b>	Université Larbi Ben M'hidi Oum El Bouaghi
Directeur de thèse	<b>Pr. GRAMA Borhane Samir</b>	Université Larbi Ben M'hidi Oum El Bouaghi
Examineur	<b>Pr. MACHAI Abdelbassat</b>	Université de Tébessa
Examineur	<b>Dr. KHEDOUMA Asma</b>	Université Abbas Laghrour Khenchela
Examineur	<b>Dr. NAILI Oumaima</b>	Université Abbas Laghrour Khenchela

**Année universitaire : 2022/2023**

## Remerciements

Ce travail a été réalisé au Laboratoire des Substances Naturelles, Molécules Bioactives et Application biotechnologiques (LSNB2A), Oum El Bouaghi.

Il m'est particulièrement agréable d'adresser mes remerciements à Monsieur **GRAMA Borhane Samir**, Professeur à l'Université d' Oum El Bouaghi, d'avoir accepté de diriger et orienter ce travail et d'avoir proposé ce sujet, pour ses qualités humaines ainsi que professionnelles, pour ses précieux conseils qui m'ont été tout le temps fructueux, Monsieur **GRAMA**, merci pour m'avoir supporté durant la réalisation de ce travail, vous méritez Professeur ma profonde gratitude et toute ma reconnaissance.

Mes profonds remerciements et reconnaissance s'adressent à Monsieur **ARHAB Rabah**, pour son aide précieuse et ses conseils judicieux, et d'avoir également accepté de présider le jury.

Je voudrais également remercier Monsieur **MACHAI Abdelbassat**, Professeur à l'université de Tébessa, Madame **KHEDOUMA Asma** et Madame **NAILI Oumaima**, Maître de conférences classe A à l'université de Kfnechela, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Un grand merci pour Monsieur **SAHAB Menouar**, professeur et directeur du laboratoire d'écologie à l'Université d' Oum El Bouaghi, de m'avoir donné la chance de travailler dans son laboratoire et pour son aide précieuse.

J'exprime mes remerciements aux membres du Laboratoire d'écologie de l'université d'Oum El Bouaghi, et surtout le professeur **KHEMAR Hicham**.

Je tiens aussi à remercier les membres du Laboratoire des Substances Naturelles, Molécules Bioactives et Application biotechnologiques (LSNB2A), de l'université d'Oum El Bouaghi.

Enfin, Je remercie toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail par un soutien moral ou matériel.

*Je tiens tout d'abord à remercier ALLAH le tout puissant et miséricordieux,*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A mon père et ma mère. Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour dont ils ne cessent de me combler, mes parents qui ont su construire pour moi un monde parfait. Qu'ALLAH leur procure bonne santé et longue vie.*

*A mes adorables sœurs : Meriem, Houda, Malak aridje et Dhikra Hanine vous avez toujours été présentes par vos bons conseils. Votre affection et votre soutien m'ont été d'un grand secours au long de mes années d'étude et ma vie personnelle. Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.*

*A mon mari Aymen, qui m'a toujours soutenue et encourager*

*A mon cher fils Yousr Watine qui m'a donné le courage pour avancer et achever cette thèse*

*A mon unique frère Ahmed Mohsine Naiim*

*A mes petits adorables neveux Baraa-Yassine et Mohamed*

*A mes beaux-parents, Hamma, Saïida, à ma belle-sœur Riham, à mes beaux-frères, Mahdi et Taki.*

*A tous mes chers enseignants et enseignantes, que ce travail soit un témoignage de ma gratitude et mon profond respect à vous. A tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer.*

*Nour Elaimane*

## Résumé

### **Modulation de l'activité des enzymes antioxydants pour l'augmentation de la production des caroténoïdes à partir de microalgues**

La biotechnologie des microalgues est devenue un domaine de recherche prometteur pour la production de sous-produits de grande valeur, durables et respectueux de l'environnement, en particulier pour les caroténoïdes. L'accumulation en masse de caroténoïdes secondaires dans les microalgues est principalement induite par le stress oxydatif des cellules. Dans cette recherche, nous avons étudié les effets de l'inhibition de l'activité des enzymes antioxydants sur la caroténogénèse chez une microalgue *Dactylococcus dissociatus* MT1. Les activités de quatre grandes familles d'enzymes antioxydantes, à savoir la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPX) et l'ascorbate peroxidase (APX), ont été inhibées par des inhibiteurs pertinents pendant la culture sous stress de *D. dissociatus* afin d'observer les effets sur la caroténogénèse. Une diminution de 91 % de l'activité a été observée pour la CAT, par rapport aux témoins sans aucun inhibiteur ajouté, suivie par 65 %, 61 % et 47 % pour les enzymes SOD, APX et GPX, respectivement. De manière concomitante, il a été constaté que cette inhibition partielle avait des influences substantielles sur l'accumulation de caroténoïdes, avec les niveaux de production les plus élevés obtenus dans les conditions d'inhibition de la CAT et une augmentation de 2,6 fois de la concentration en caroténoïdes observée, en comparaison avec les conditions de culture de contrôle. Nous concluons que la modulation des activités des enzymes antioxydantes pourrait conduire à la surproduction de caroténoïdes dans cette culture cellulaire de microalgues, cette nouvelle approche d'optimisation des processus de caroténogénèse pour les cultures cellulaires de *D. dissociatus* pourrait être transférable à d'autres systèmes de culture cellulaire et pourrait avoir un impact important sur l'industrie de la production de caroténoïdes.

**Mots clés :** Microalgue, *Dactylococcus dissociatus*, enzymes antioxydantes, inhibiteurs, caroténoïdes, SOD, CAT, APX, GPX.

## **Abstract**

### **Modulation of antioxidant enzyme activity to increase carotenoid production from microalgae**

Microalgal biotechnology has become a promising field of research for the production of valuable, sustainable and environmentally friendly byproducts, especially for carotenoids. Bulk accumulation of secondary carotenoids in microalgae are mostly induced by oxidative stress of cells. In this research, we investigated the effects of antioxidant enzyme activity inhibition on carotenogenesis in a microalga *Dactylococcus dissociatus* MT1. The activities of four major antioxidant enzyme families, namely superoxide dismutase (SOD), catalases (CAT), glutathione peroxydases (GPX) and ascorbate peroxidases (APX), were inhibited by relevant inhibitors during the stressed cultivation of *D. dissociatus* to observe the effects on carotenogenesis. A 91% decrease in activity was observed for CAT, comparing with controls without any inhibitors added, followed by 65%, 61%, and 47% for the enzymes SOD, APX, and GPX, respectively. Concomitantly, it was found that this partial inhibition had substantial influences on the accumulation of carotenoids, with the highest production levels obtained in CAT inhibition conditions and an increase of 2.6 times of carotenoid concentration observed, comparing with control cultivation conditions. We conclude that the modulation of antioxidant enzyme activities could lead to the overproduction of carotenoids in this microalgal cell culture, and we expect that this novel approach of optimizing carotenogenesis processes for *D. dissociatus* cell cultures could be transferrable to other cell culture systems and might have an important impact on the carotenoid production industry.

**Keywords:** Microalgae, *Dactylococcus dissociatus*, antioxidant enzymes, inhibitors, carotenoids, SOD, CAT, APX, GPX.

## تعديل نشاط الإنزيمات المضادة للأكسدة لزيادة إنتاج الكاروتين من طرف الطحالب الدقيقة

أصبحت بيو تكنولوجيا الطحالب الميكروسكوبية مجالاً واعدًا للبحث وإنتاج منتجات ثانوية قيمة ومستدامة وصديقة للبيئة، خاصة الكاروتينات. ينتج التراكم الكتلي للكاروتينات الثانوية في الطحالب الميكروسكوبية عن طريق الإجهاد التأكسدي للخلايا. في هذا البحث درسنا آثار تثبيط نشاط الإنزيمات المضادة للأكسدة على تحسين عملية تكوين الكاروتين في الطحالب الميكروسكوبية *Dactylococcus dissociatus MTI* عن طريق إعاقة أنشطة أربع عائلات رئيسية من إنزيمات مضادات الأكسدة، وهي ديسموتاز (SOD)، والكتالاز (CAT)، والجلوتاثيون بيروكسيداز (GPX)، والأسكورات بيركسوداز (APX)، بواسطة مثبطات مناسبة أثناء الزراعة تحت الضغط لمراقبة التأثيرات على تكوين الكاروتين. لوحظ انخفاض بنسبة 91% في نشاط CAT، مقارنة بالشاهد بدون أي مثبط مضاف، تليها 65% و 61% و 47% لإنزيمات SOD و APX و GPX، على التوالي. بالتزامن مع ذلك وجد أن هذا التثبيط الجزئي له تأثيرات كبيرة على تراكم الكاروتين، مع تحقيق أعلى مستويات الإنتاج في ظل ظروف تثبيط CAT وزيادة 2.6 ضعف في تركيز الكاروتين المرصود مقارنة بالشاهد. نستنتج أن التعديل من أنشطة الإنزيمات المضادة للأكسدة يمكن أن يؤدي إلى الإفراط في إنتاج الكاروتينات في مزرعة خلايا الطحالب الميكروسكوبية، ونعتقد أن نهج التحسين الجديد هذا لعمليات إنتاج الكاروتين لمزارع الخلايا من *D. dissociatus* يمكن نقلها إلى أنظمة زراعة الخلايا الأخرى على مستوى أكبر ويمكن أن يكون لها تأثير مهم على الصناعة وإنتاج الكاروتين.

## الكلمات المفتاحية :

الطحالب الميكروسكوبية، *Dactylococcus dissociatus*، الإنزيمات المضادة للأكسدة، المثبطات، الكاروتين، CAT، SOD، APX، GPX

## Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
I. Revue bibliographique	
<b>1. Présentation générale des microalgues</b> .....	<b>6</b>
• 1.1. Classification et distribution.....	<b>8</b>
• 1.2. Mode de culture.....	<b>10</b>
○ 1.2.1. Phototrophique.....	<b>10</b>
○ 1.2.2. Hétérotrophique.....	<b>10</b>
○ 1.2.3. Mixotrophique.....	<b>10</b>
<b>2. Applications biotechnologiques des microalgues</b> .....	<b>10</b>
• 2.1. Production de biomasse à but alimentaire.....	<b>12</b>
○ 2.1.1. Alimentation humaine.....	<b>12</b>
○ 2.1.2. Alimentation animale.....	<b>13</b>
• 2.2. Production de biomolécules spécifiques à haute valeur ajoutée.....	<b>14</b>
○ 2.2.1. Domaine pharmaceutique.....	<b>14</b>
○ Les antioxydants.....	<b>15</b>
○ Les acides gras.....	<b>16</b>
○ Les polysaccharides.....	<b>16</b>
○ Les halogènes.....	<b>16</b>
○ 2.2.2. Domaine cosmétique.....	<b>17</b>
○ 2.2.3. Domaine énergétique.....	<b>19</b>
○ Le bioéthanol.....	<b>19</b>
○ Le biodiesel.....	<b>20</b>
○ Le bio-oil.....	<b>20</b>
○ Le biométhane.....	<b>20</b>
○ Le biohydrogène.....	<b>21</b>
• 2.3. Applications environnementales.....	<b>22</b>
○ 2.3.1. Séquestration de CO <sub>2</sub> .....	<b>22</b>
○ 2.3.2. Traitement des eaux usées.....	<b>23</b>
<b>3. Physiologie cellulaire des microalgues</b> .....	<b>24</b>
• 3.1. Pigments photosynthétiques.....	<b>24</b>
✓ La chlorophylle.....	<b>25</b>
• 3.2. Les caroténoïdes.....	<b>26</b>
○ β -Carotènes (C <sub>40</sub> H <sub>56</sub> ).....	<b>27</b>
○ Lycopène.....	<b>27</b>
○ Xanthophylles.....	<b>28</b>
○ Astaxanthine.....	<b>29</b>
○ Lutéine.....	<b>31</b>
• 3.3. Les phycobilines.....	<b>32</b>
<b>4. La caroténogénèse</b> .....	<b>33</b>
• Facteurs induisant la biosynthèse des caroténoïdes secondaire.....	<b>35</b>
<b>5. Le stress oxydatif</b> .....	<b>36</b>
• 6.1. Espèces réactives d'oxygène (ERO).....	<b>37</b>
• 6.2. Type des ERO.....	<b>38</b>
<b>6. Systèmes antioxydants</b> .....	<b>39</b>

• 6.1. Antioxydants enzymatiques.....	39
○ Superoxydes dismutase.....	40
○ Fe-SOD.....	41
○ Mn-SOD.....	41
○ Cu/Zn-SOD.....	41
○ Catalase.....	42
○ Peroxydase (POD).....	42
○ Glutathion peroxydase (GPx).....	43
○ Aascorbate peroxydase (APx).....	43
○ Glutathion réductase (GR).....	44
• 6.2. Les antioxydants non enzymatiques.....	45
○ 7.2.1. Pigments.....	45
○ 7.2.2. Les vitamines.....	45
○ 7.2.3. Les polyphénols.....	46
○ 7.2.4. L'ascorbate.....	46
○ 7.2.5. Les lipides.....	47
○ 7.2.6. Le glutathion.....	47
<b>II. Matériels et méthodes.....</b>	<b>48</b>
• 1. Souche et milieu.....	48
• 2. Conditions de culture des cellules.....	49
• 3 Ajout d'inhibiteurs d'enzymes.....	50
• 4. Techniques d'analyse.....	51
○ 3.4.1. Analyses physico-chimiques.....	51
○ 3.4.2. Densité de la culture cellulaire.....	51
○ 3.4.3. Analyse du nitrate.....	51
○ 3.4.4. Détermination des pigments.....	51
○ 3.4.5. Analyse des lipides.....	52
○ 3.4.6. Mesure de l'activité enzymatique.....	53
✓ La catalase.....	53
✓ La superoxyde dismutase (SOD).....	53
✓ L'ascorbate peroxydase (APX).....	54
✓ La glutathione peroxidase (GPX).....	54
○ 3.4.7 Analyse statistique.....	55
<b>III. Résultats et discussion.....</b>	<b>56</b>
• 1. Croissance cellulaire et caroténogénèse.....	57
• 2. Pigments photosynthétiques.....	60
• 3. Augmentation du contenu en lipides.....	63
• 4. Accumulation de caroténoïdes secondaires.....	65
• 5. Effets de l'ajout d'inhibiteurs.....	69
<b>Conclusion.....</b>	<b>79</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>81</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1.1</b>	Diversité morphologique des microalgues (Filali, 2012)	<b>7</b>
<b>Figure 1.2</b>	Prévisions de mise sur le marché de produits issus de microalgues à l'horizon 2020 (Titica, 2012).	<b>11</b>
<b>Figure 1.3</b>	Domaines d'application des microalgues (Celis, 2009).	<b>12</b>
<b>Figure 1.4</b>	Les biocarburants issus de microalgues.	<b>21</b>
<b>Figure 1.5</b>	Utilisation des microalgues pour le traitement des eaux usées (oxygénation photosynthétique) (Tredici <i>et al.</i> , 2009).	<b>24</b>
<b>Figure 1.6</b>	Structures chimiques des principaux caroténoïdes (De Jesus Raposo <i>et al.</i> , 2015).	<b>31</b>
<b>Figure 1.7</b>	Les voies de la biosynthèse des caroténoïdes (Paniagua-Michel <i>et al.</i> , 2012).	<b>35</b>
<b>Figure 1.8</b>	Représentation schématique du stress oxydatif chez un sujet normal, durant le vieillissement et dans le cas des maladies neurodégénératives (Cenini <i>et al.</i> , 2019).	<b>36</b>
<b>Figure 1.9</b>	ERO produits par les homologues de l'oxydase de la voie respiratoire (RBOHs), les peroxyosomes (Per), les mitochondries (Mit), les chloroplastes (Chl) et la cellule de la paroi liée à la peroxydase (PER) (Mittler, 2017)	<b>38</b>
<b>Figure 1.10</b>	Génération de différents ERO par transfert d'énergie ou réduction séquentielle d'oxygène (Appel et Hirt, 2004)	<b>38</b>
<b>Figure 1.11</b>	Les enzymes antioxydants qui fonctionnent en cascade (Guleri, S., & Tiwari, 2020).	<b>40</b>
<b>Figure 1.12</b>	Les voies cellulaires des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et leur neutralisation chez les microalgues (Cirulis <i>et al.</i> , 2013).	<b>44</b>
<b>Figure 2.1</b>	A) <i>Dactylococcus dissociatus</i> MT1 observée au microscope photonique (grossissement x 40) en phase verte. B) <i>Dactylococcus dissociatus</i> MT1 observée au microscope photonique (grossissement x 40) en phase de stress. C-D) Culture de <i>Dactylococcus dissociatus</i> MT1 sur boîte de Pétri durant la phase verte.	<b>48</b>
<b>Figure 2.2</b>	Culture de <i>Dactylococcus dissociatus</i> MT1 durant la phase verte (phase de croissance)	<b>49</b>
<b>Figure 2.3</b>	Culture de <i>Dactylococcus dissociatus</i> MT1 durant le processus de la caroténogénèse.	<b>50</b>
<b>Figure 3.1</b>	A) Culture de cellules stressées à T=0 (inoculation). B) Les conditions de culture utilisés pour induire la caroténogénèse. C) Observation microscopique de la morphologie cellulaire et de l'évolution des pigments cellulaires. D) Interaction proposée entre les cofacteurs (Fe, Cu), les enzymes antioxydantes catalase (CAT), superoxyde dismutase (SOD), ascorbate peroxydase (APX), les espèces réactives de l'oxygène (ROS), le photosystème et les caroténoïdes secondaires de haute valeur (canthaxanthine, astaxanthine et adonixanthine).	<b>59</b>
<b>Figure 3.2</b>	Comparaison du poids sec entre l'inoculation (T=0) et la fin de l'expérience (jour 9) du processus de caroténogénèse pour toutes les cultures. La figure représente la concentration en poids sec en g L <sup>-1</sup> de la culture.	<b>60</b>
<b>Figure 3.3</b>	Comparaison des concentrations de chl <sub>a</sub> entre l'inoculation (T=0) et la fin de l'expérience (jour 9) du processus de caroténogénèse pour toutes	<b>61</b>

les cultures. La figure représente la concentration en chlorophylle a en  $\text{mg L}^{-1}$  de la culture.

- Figure 3.4** Comparaison de la teneur en chla, T-car et lipides par unité de masse cellulaire sèche entre l'inoculation (T=0) et la fin de l'expérience (jour 9) du processus de caroténogenèse pour toutes les cultures. **62**
- Figure 3.5** Comparaison de la teneur des lipides entre l'inoculation (T=0) et la fin de l'expérience (jour 9) du processus de caroténogenèse pour toutes les cultures. La concentration en lipides en  $\text{mg L}^{-1}$  de la culture. **65**
- Figure 3.6** Comparaison des concentrations de T-car entre l'inoculation (T=0) et la fin (jour 9) du processus de caroténogenèse pour toutes les cultures. La figure représente la concentration en caroténoïdes totaux en  $\text{mg L}^{-1}$  de la culture. **66**
- Figure 3.7** Activités enzymatiques pour chaque milieu de culture. T=0 représente l'activité enzymatique à l'inoculation. Le contrôle représente l'activité enzymatique de la culture témoin à la fin de la culture. I-enzyme, représente l'activité enzymatique de la culture à la fin de la culture. La Fig. 4.7.A représente l'activité CAT, la Fig. 4.7.B l'activité SOD, la Fig. 4.7.C l'activité GPX et la Fig. 4.7.D l'activité APX. **70**
- Figure 3.8** Activités enzymatiques pour chaque milieu de culture par unité de masse cellulaire sèche. T=0 représente l'activité enzymatique à l'inoculation par unité de masse cellulaire sèche. La culture de contrôle, représente l'activité enzymatique de la culture témoin à l'arrêt par unité de masse cellulaire sèche. I-enzyme, représente l'activité enzymatique par unité de masse cellulaire sèche de la culture à la fin de la culture. La Fig. 4.8.A représente l'activité CAT, la Fig. 4.8.B l'activité SOD, la Fig. 4.8.C l'activité GPX et la Fig. 4.8.D l'activité APX. **71**

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.1</b>	Diversité des microalgues eucaryotes et procaryotes, marines et d'eau douce (Sialve et Steyer, 2013).	<b>9</b>
<b>Tableau 1.2</b>	Applications des différents produits extraits des microalgues (Chokshi <i>et al.</i> , 2017).	<b>17</b>
<b>Tableau 1.3</b>	Les espèces algales et leurs applications en cosmétique (Guleri et Tiwari, 2020).	<b>18</b>
<b>Tableau 4.1</b>	Poids sec, cha, chb, T-car et concentrations en lipides entre l'inoculation (T=0) et la fin de l'expérience (jour 9) pendant le processus de caroténogénèse pour toutes les cultures.	<b>58</b>

## Liste des abréviations

- APC** allophycocyanine
- APX** ascorbate peroxidase
- ATP** adénosine triphosphate
- CAT** catalase
- DHA** acide docosahexaénoïque
- DMAPP** diméthylallyl diphosphate
- DMLA** dégénérescence maculaire liée à l'âge
- DRO** dérivé réactif de l'oxygène
- ERO** espèce réactive de de l'oxygène
- Fe-SOD** superoxyde dismutase fer
- GPX** glutathion peroxydase
- GR** glutathion réductase
- IPP** isopentenyl pyrophosphate
- LDL** low density lipoprotein
- Mn-SOD** superoxyde dismutase manganèse
- PC** phycocyanine
- PE** phycoerythrine
- PEC** phycoerythrocyanine
- PH** potentiel d'hydrogène
- POD** peroxydase
- SOD** superoxyde dismutase
- TAG** triacylglycérol
- UV** rayon ultraviolet

# **Introduction**

## **1. Introduction**

Les microalgues sont des organismes photosynthétiques microscopiques qui appartiennent au groupe de micro-organismes appelés algues. On les trouve dans divers environnements aquatiques, y compris les habitats d'eau douce et marins. Les microalgues sont connues pour leur capacité à convertir la lumière du soleil, l'eau et le dioxyde de carbone en matière organique par photosynthèse, tout comme les plantes (Person *et al.*, 2011).

Il existe une grande variété d'espèces de microalgues, allant d'organismes unicellulaires comme la *chlorelle* et la *spiruline* à des formes multicellulaires plus complexes. Ces organismes peuvent avoir une structure unicellulaire, coloniale ou filamenteuse. Ils se présentent sous différentes formes et tailles, notamment des sphères, des bâtonnets, des spirales et des formes ramifiées (Barsanti et Gualtieri, 2006).

Les microalgues jouent un rôle crucial dans les écosystèmes marins et d'eau douce en tant que producteurs primaires. Elles sont à la base de la chaîne alimentaire et fournissent des nutriments et de l'énergie à d'autres organismes. En outre, les microalgues produisent une quantité importante d'oxygène par photosynthèse, contribuant ainsi à l'approvisionnement en oxygène de la terre (Grama *et al.*, 2014a).

Les microalgues ont suscité un vif intérêt en raison de leurs applications potentielles dans divers domaines, notamment la biotechnologie, les biocarburants, l'aquaculture et le traitement des eaux usées. Les applications les plus importantes de ces microorganismes sont :

**Production de biocarburants :** certaines espèces de microalgues ont une teneur élevée en lipides, qui peuvent être extraits et convertis en biodiesel. Les microalgues ont le potentiel de produire des biocarburants de manière plus efficace et plus durable que les cultures traditionnelles comme le maïs ou le soja (Barsanti et Gualtieri, 2006).

**Compléments alimentaires et aliments pour animaux :** certaines microalgues, comme la chlorelle et la spiruline, sont consommées comme compléments alimentaires en raison de leur riche profil nutritionnel. Elles sont une source de protéines, d'acides gras essentiels, de vitamines et de minéraux (Person *et al.*, 2011).

**Capture et utilisation du carbone :** les microalgues peuvent absorber le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) de l'atmosphère ou des émissions industrielles, contribuant ainsi à réduire les émissions de gaz à effet de serre. En outre, elles peuvent être utilisées dans les systèmes de captage et de stockage du carbone (CSC) (Barsanti et Gualtieri, 2006).

Traitement des eaux usées : les microalgues peuvent être utilisées dans les processus de traitement des eaux usées pour éliminer les nutriments, tels que l'azote et le phosphore, des eaux polluées. Elles peuvent contribuer à réduire l'impact environnemental des rejets d'eaux usées (Pulz et Gross, 2004).

Produits pharmaceutiques et cosmétiques : certaines espèces de microalgues produisent des composés susceptibles d'avoir des applications pharmaceutiques ou cosmétiques. Il s'agit notamment d'antioxydants, de pigments et de composés bioactifs aux propriétés antimicrobiennes ou anti-inflammatoires (Grama *et al.*, 2014a).

Des efforts de recherche et de développement sont en cours pour explorer tout le potentiel des microalgues et de leurs applications. Leur polyvalence, leur taux de croissance rapide et leur capacité à se développer dans diverses conditions environnementales en font une ressource prometteuse pour des solutions durables dans de nombreuses industries (Pulz et Gross, 2004).

Contrairement aux caroténoïdes primaires, tels que le bêta-carotène et le lycopène, qui sont directement impliqués dans la photosynthèse et la production d'énergie, les caroténoïdes secondaires jouent généralement des rôles supplémentaires dans les organismes qui les produisent. Ils remplissent diverses fonctions, notamment la protection contre le stress environnemental et la signalisation (Grama *et al.*, 2016a).

Les caroténoïdes secondaires, également connus sous le nom de xanthophylles, sont une classe de pigments naturels présents dans divers organismes, y compris les plantes, les algues et les bactéries. Ils sont dérivés des caroténoïdes, qui sont des pigments liposolubles responsables de la couleur jaune à orange que l'on trouve dans de nombreux végétaux (Grama *et al.*, 2016a).

Les caroténoïdes sont des terpénoïdes pigmentés, qui peuvent être synthétisés par les microalgues ou les plantes comme pigments accessoires de l'appareil photosynthétique ou comme métabolites secondaires en réponse au stress oxydatif intracellulaire. Les caroténoïdes sont de puissants antioxydants qui trouvent des applications dans les industries alimentaire, cosmétique, aquaculture et en industrie pharmaceutique. Il a été démontré que deux des principaux caroténoïdes (astaxanthine et adonixanthine) accumulés dans la souche de *Dactylococcus dissociatus* MT1 isolée du désert du Sahara en Algérie ont des propriétés anti-tumorales et anti-carcinogènes (Maoka *et al.*, 2013 ; Grama *et al.*, 2014b). Par conséquent, il a

récemment été suggéré que certains caroténoïdes pourraient être utilisés comme agents chimiothérapeutiques ou anti-angiogéniques (Ganesan *et al.*, 2013).

Bien qu'actuellement la majorité des caroténoïdes soient produits par synthèse chimique, la production de caroténoïdes à partir de microalgues suscite depuis peu un intérêt croissant. Premièrement, les caroténoïdes chimiques sont synthétisés à partir de composés pétrochimiques, ce qui n'est pas durable. Deuxièmement, en raison de préoccupations sanitaires et environnementales, la consommation de caroténoïdes chimiques est limitée pour les humains et certains animaux, contrairement aux caroténoïdes naturels qui ont déjà été commercialisés pour le marché des compléments alimentaires (ex. BioAstinm, Nutrex-Hawaii) (Li *et al.*, 2011). L'utilisation des antioxydants synthétiques a diminué en raison de leur activité cancérigène supposée ainsi que du rejet généralisé des additifs synthétiques dans l'alimentation par les consommateurs (Namiki, 1990). Par ailleurs, les caroténoïdes naturels peuvent être obtenus à partir de cultures cellulaires de microalgues, ce qui est particulièrement prometteur en raison de leurs propriétés respectueuses de l'environnement et de leur nature négative en carbone.

L'accumulation massive de caroténoïdes secondaires est une réponse physiologique pour contrer les effets délétères du stress oxydatif intracellulaire causé par les espèces réactives de l'oxygène (ROS), comme l'anion superoxyde ou  $H_2O_2$ . Les ROS peuvent être produites lorsque le flux linéaire d'électrons (LEF) dans la chaîne de transport d'électrons photosynthétique (ETS) est perturbé au niveau des cytochromes ou de la ferrédoxine, ou si le LEF est bloqué par un excès d'équivalent réducteur terminal (Solovchenko *et al.*, 2013). Les ROS en tant que sous-produits du métabolisme oxydatif sont produits dans les organismes aérobies, ce qui est un phénomène ubiquitaire et peut être atténué par les systèmes antioxydants des cellules. Cependant, à des taux de production élevés, ces espèces peuvent être très délétères pour les cellules et organismes vivants. Lorsque les niveaux de ces ROS dépassent la capacité du système antioxydant à les traiter, les dommages surviennent (Pinto *et al.*, 2003). De même, avec l'augmentation de la concentration intracellulaire en oxygène, l' $O_2$  commence à concurrencer le  $CO_2$  au niveau du site actif de l'enzyme RuBisCo, ce qui induit la photorespiration et aboutit finalement à la production de  $H_2O_2$ , un oxydant puissant et toxique pour les cellules. La décomposition de  $H_2O_2$  est catalysée par l'activité de l'ascorbate peroxydase (APX) ou par la catalase (CAT), qui sont toutes les deux des hémoprotéines. En plus de la décomposition des ROS par catalyse enzymatique, les caroténoïdes possèdent également une forte activité antioxydante et sont des piègeurs efficaces de ROS (Edge *et al.*, 1997). Il n'est pas surprenant que le niveau de ROS intracellulaire puisse être lié à la fois à

l'activité des enzymes antioxydants et à la production de caroténoïdes (Michelet *et al.*, 2013). Il faut noter que les dommages oxydatifs peuvent résulter soit de l'augmentation des espèces réactives (ROS) dans la cellule, soit de la diminution de l'efficacité de la cellule à les éliminer (Arunakumara et Xuecheng, 2008).

Dans le système végétal, y compris les microalgues, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont constamment générées par la libération conséquente d'électrons vers l'oxygène moléculaire à travers les activités de transport d'électrons de divers organites, y compris les chloroplastes, les mitochondries et la membrane plasmique (Foyer, 1997, Mallick et Mohn, 2000). En outre, les stress biotiques et abiotiques peuvent entraîner une augmentation supplémentaire des niveaux de ROS (Rabbani *et al.*, 1998). Les ROS sont hautement toxiques et résultent de la réduction partielle de l'oxygène moléculaire non nuisible. Les formes réactives de l'oxygène comprennent le radical superoxyde ( $O_2^-$ ), le radical hydroxyle ( $OH^\cdot$ ) et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Tous ces composants peuvent interagir avec des biomolécules particulières, affectant ou inhibant les fonctions biochimiques et entraînant la dégradation oxydative d'éléments cellulaires tels que l'ADN, les protéines, les lipides et les pigments. Les ROS sont également impliqués dans l'induction de la tolérance au stress et ils agissent comme des composés cytotoxiques (Mallick et Mohn, 2000; Partk *et al.*, 2008). A titre d'exemple, les chloroplastes des algues sont constitués d'un système complexe de membranes avec des niveaux élevés d'acides gras polyinsaturés, qui peuvent tous être potentiellement affectés par la peroxydation (Halliwell et Gutteridge, 1999). Ces composés dangereux sont générés à trois endroits principaux tout au long du processus photosynthétique : le LHC du PSII, le centre de réaction du PSII et le côté accepteur du PSI (Niyogi, 1999).

L'état actuel de l'art pour l'induction de ces stress aux fins de la caroténogénèse secondaire consiste à combiner un stress nutritionnel avec une intensité lumineuse sursaturante (Solovchenko *et al.*, 2013). Cependant, il est difficile et souvent impossible d'imposer des intensités lumineuses sursaturantes à des cultures cellulaires denses de phototrophes, lesquelles sont nécessaires à un processus économiquement viable. En effet, le goulot d'étranglement des bioprocédés phototrophes est la pénétration des photons dans la culture cellulaire. Ainsi, la manipulation de la composition intracellulaire des ROS en affectant l'état d'oxydoréduction intracellulaire, soit par nutrition, soit en ciblant des conditions spécifiques de culture cellulaire par oxymétrie, est une approche prometteuse pour augmenter la production de caroténoïdes secondaires tout en évitant le goulot d'étranglement de la pénétration des photons dans la culture cellulaire. De plus, les caroténoïdes secondaires étant photosensibles, les fortes intensités

lumineuses utilisées pour induire leur production peuvent également provoquer leur dégradation. Ainsi, l'induction de la caroténogenèse secondaire par des méthodes qui réduisent la dépendance à l'égard d'apports saturés de photons pourrait offrir l'avantage d'augmenter, plutôt que de dégrader, les biomolécules cibles.

L'objectif de ce travail était d'étudier l'amélioration de la biosynthèse des caroténoïdes dans les microalgues en manipulant le métabolisme cellulaire des ROS des cellules d'algues. Plus précisément, l'induction de la caroténogenèse a été réalisée tout d'abord par des facteurs de stress conventionnels (par exemple, la carence en nitrogène, le stress osmotique, la forte intensité lumineuse, etc.), puis ces méthodes conventionnelles seront combinées à de nouvelles techniques de bioprocédés de pointe qui augmenteront la production de ROS en influençant des paramètres qui n'ont pas été étudiés, tels que l'inhibition de l'activité enzymatique antioxydante. Cette approche nouvelle et prometteuse permettra de mettre au point un bioprocédé pour les microalgues qui évite la nécessité de délivrer des intensités lumineuses élevées dans des cultures cellulaires denses et qui sera donc plus évolutif et plus efficace que les bioprocédés conventionnels.

## **I. Revue bibliographique**

## **1. Présentation générale des microalgues**

Le terme algue désigne à la fois les macroalgues et les microalgues. Le nombre d'espèces d'algues a été estimé entre un et dix millions, et la majorité d'entre eux sont des microalgues (Barsanti et Gaultieri, 2005). Les algues bleu-vert (cyanobactéries) sont des microorganismes photosynthétiques procaryotes, alors que les microalgues à proprement dite sont des microorganismes photosynthétiques eucaryotes unicellulaires ou pluricellulaires (Sirois, 2013).

Les algues se produisent sous des formes différentes telles que la forme unicellulaire microscopique, les conglomérats macroscopiques multicellulaires lâches ou en filme, aussi comme des colonies emmêlées ou ramifiées, et comme des formes plus complexe, la forme feuille ou lame (Barsanti et Gaultieri, 2005).

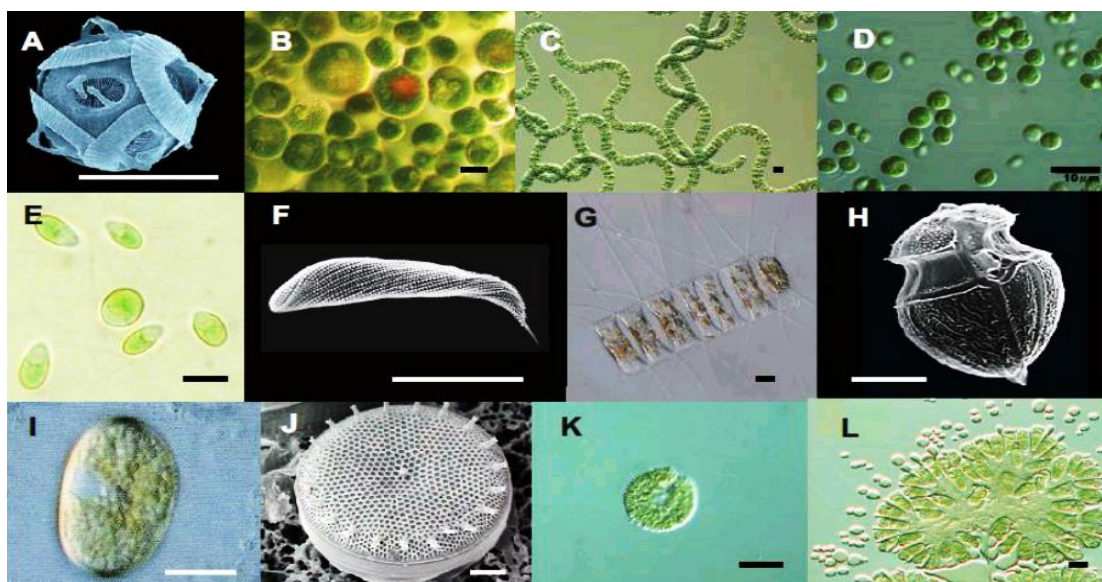
Les microalgues sont caractérisées par leur petite taille, généralement inférieure à 200 micromètres, bien que certaines puissent atteindre des tailles plus importantes. Elles sont principalement photosynthétiques, ce qui signifie qu'elles utilisent la lumière du soleil comme source d'énergie pour produire leur propre nourriture. Grâce à la photosynthèse, elles convertissent le dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) et l'eau en composés organiques, tout en libérant de l'oxygène. Les microalgues représentent le premier maillon de la chaîne alimentaire dans les écosystèmes aquatiques ; elles possèdent la capacité d'assimiler le  $\text{H}_2\text{O}$  et le  $\text{CO}_2$ , qui, à l'aide de la lumière du soleil, sont convertis en composés organiques complexes qui sont ensuite gardés à l'intérieur ou libérés de la cellule. Ces micro-organismes sont ubiquitaires et sont bien adaptés pour survivre sous un large intervalle de stress environnementaux, y compris (mais sans s'y limiter) la chaleur, le froid, la sécheresse, la salinité, la photo-oxydation, l'anaérobiose, la pression osmotique et l'exposition aux UV (Guedes *et al.*, 2011; Ben Ouada *et al.*, 2018).

Photoautotrophie, hétérotrophie ou bien mixotrophie sont les modes de croissance adoptés par les différentes microalgues (Borowitzka, 1999), dont se base le choix de l'espèce pour les différentes applications microalgales. Les microalgues ont la faveur de se développer très rapidement avec une division cellulaire de l'ordre de quelques heures à un jour, donc permet d'atteindre une densité cellulaire (biomasse) importante (Cadoret *et al.*, 2008).

Leur croissance fait appel à plusieurs facteurs de croissance (composés azotés et phosphatés, potassium, du fer, du soufre, des métaux aussi des vitamines) et conditions de culture tel que : l'eau, les nutriments, la lumière, le  $\text{CO}_2$ , la température et le pH de la culture, ainsi que l'agitation. En fonction des souches cultivées l'eau est douce, marine ou saumâtre (Person, 2011).

Les microalgues jouent un rôle crucial dans les écosystèmes, notamment en tant que producteurs primaires à la base de la chaîne alimentaire. Elles fournissent de l'oxygène, recyclent les nutriments et servent de nourriture à de nombreux organismes, tels que les zooplanctons, les mollusques, les poissons et les invertébrés marins. En plus de leur rôle écologique, les microalgues ont également un intérêt économique croissant. Elles sont utilisées dans de nombreux domaines tels que l'alimentation humaine et animale, la cosmétique, la production d'enzymes et de produits chimiques, la purification de l'eau, la production d'énergie renouvelable (biocarburants), la séquestration du CO<sub>2</sub> et la bioremédiation (Grama et al., 2014a).

Leur capacité à produire une grande diversité de composés bioactifs, tels que les pigments, les acides gras, les polysaccharides, les protéines, les antioxydants et les enzymes, en fait des candidats prometteurs pour de nombreuses applications industrielles et médicales. La recherche sur les microalgues se poursuit afin de mieux comprendre leur biodiversité, leur physiologie, leur génétique et leurs capacités métaboliques, dans le but d'exploiter pleinement leur potentiel dans divers domaines et de contribuer au développement durable (Grama et al., 2016a).



**A : *Gephyrocapsa***                      **E : *Dunaliella tertiolecta***                      **J : *Bacillariophyceae***  
**B : *Haematococcus lacustris***                      **F : *Chaetoceros calcitrans***                      **K : *Raphidophyceae***  
**C : *Spirulina platensis***                      **H : *Dinophysis acuminata***                      **L : *Botryococcus***  
**D : *Chlorella vulgaris***                      **I : *Alexandrium***  
*La longueur du trait dans chaque figure est égale à 10µm.*

**Figure 1.1 :** Diversité morphologique des microalgues (Filali, 2012).

## **1.1. Classification et distribution**

La capacité d'adaptation et de survie des microalgues telles qu'elles sont, leurs donnent la faveur d'être aptes à coloniser tous types de milieux (Filali, 2012). On les trouve aussi dans les milieux terrestres comme dans les eaux chaudes et froides, dans les eaux acides, alcalines ou encore saumâtres, dans les grottes, associées en symbioses avec tout type d'organisme vivant et même parasites, y compris l'homme. Elles sont également capables de se croître sur des surfaces rigides, telles que les façades des maisons et les troncs d'arbres. On peut trouver également des microalgues sous la forme d'une croûte gluante appelée « biofouling » et sur les structures immergées comme les coques de bateaux (Becerra-Celis, 2009).

Sur le plan de la systématique, les algues sont aussi très diversifiées ce qui témoigne de leur très longue histoire génétique (Person, 2011). La classification des algues est complexe et fait appel à plusieurs critères (morphologiques et métaboliques) et reste un défi à relever avec les progrès de la génomique. Les « algues » forment ainsi un large assemblage artificiel d'organismes phylogénétiquement éloignés (Rastoin, 2016). Les microalgues sont classées en différentes divisions taxonomiques en fonction de leurs caractéristiques morphologiques, physiologiques et génétiques. Les divisions taxonomiques courantes des microalgues sont:

- Cyanobactéries (Cyanophyta) : aussi appelées "algues bleues", les cyanobactéries sont des microorganismes photosynthétiques qui ont des caractéristiques bactériennes mais sont incluses dans le groupe des microalgues. Elles sont présentes dans divers environnements, y compris les eaux douces et marines, et peuvent former des colonies filamenteuses ou des agrégats.
- Diatomées (Bacillariophyta) : les diatomées sont des microalgues unicellulaires présentes dans les eaux douces et marines. Elles ont une paroi cellulaire siliceuse complexe, appelée frustule, qui leur donne une forme caractéristique en boîte ou en fuseau. Les diatomées jouent un rôle important dans la production d'oxygène et la chaîne alimentaire marine.
- Dinoflagellés (Dinophyta) : les dinoflagellés sont des microalgues unicellulaires présentes dans les environnements aquatiques. Ils ont souvent des flagelles qui leur permettent de se déplacer dans l'eau. Certains dinoflagellés sont bioluminescents, tandis que d'autres peuvent produire des toxines marines responsables des marées rouges.
- Chlorophytes (Chlorophyta) : les chlorophytes, également connues sous le nom d'"algues vertes", sont des microalgues présentes dans divers habitats aquatiques et

terrestres. Elles sont caractérisées par leur pigmentation verte due à la présence de chlorophylle. Les chlorophytes peuvent être unicellulaires, coloniales ou filamenteuses.

- Euglénophytes (Euglenophyta) : les euglénophytes sont des microalgues unicellulaires présentes dans les eaux douces. Elles ont des caractéristiques à la fois végétales et animales, car elles peuvent effectuer la photosynthèse mais également se déplacer grâce à un flagelle.
- Prymnesiophytes (Prymnesiophyta) : les prymnesiophytes sont des microalgues présentes principalement dans les eaux marines. Elles comprennent des espèces comme les coccolithophoridés, qui ont des structures calcifiées appelées coccolithes.
- Rhodophytes (Rhodophyta) : les rhodophytes, également connues sous le nom d'"algues rouges", sont des microalgues principalement marines. Elles tirent leur couleur rouge caractéristique de la présence de pigments appelés phycoérythrine et phycocyanine (Barsanti et Gualtieri, 2006).

Les microalgues composent un groupe phylogénique très diversifié de procaryotes (les cyanobactéries) et eucaryotes (les algues vertes, rouges et brunes) (Person, 2011). Elles sont caractérisées essentiellement par l'absence de racines, de tissus vasculaires et de feuilles mais pourvus de la chlorophylle ainsi que d'autres pigments pour assurer la photosynthèse (Becerra-Celis).

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

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

## **1.2. Mode de culture**

Pour cultiver des microalgues il existe deux processus les plus répandus sont :

Le système de bassin ouvert qui est moins préférable à cause de la limitation de contrôle de différents paramètres de culture ( $O_2$ ,  $CO_2$ , pH et  $T^\circ$ ) ainsi que la contamination ; et le système de photobioréacteur fermé qui fournit un contrôle de paramètres facile et peut prévenir les contaminations. Cependant, les photobioréacteurs ont un coût initial élevé et une construction spécifique à l'espèce (Rezić *et al.*, 2013). La culture des microalgues pour une biomasse importante peut être réalisée dans des photobioréacteurs fermés ou dans des bassins ouverts selon l'objectif fixé (à l'espèce cultivée et aux molécules d'intérêt cibles (Bonfond *et al.*, 2020; Muhammad *et al.*, 2020). Les cultures hétérotrophes, plus un mode mixotrophique secondaire pour les souches hétérotrophes. (Sun *et al.*, 2015).

### **1.2.1. Phototrophique**

La production phototrophique de biomasse algale fait référence au processus par lequel les microalgues utilisent la lumière du soleil comme source d'énergie pour la photosynthèse, convertissant ainsi le dioxyde de carbone ( $CO_2$ ) et les nutriments en biomasse. C'est un processus clé dans la culture des microalgues à des fins commerciales, telles que la production d'aliments, d'ingrédients, de biocarburants et d'autres produits (Barsanti et Gualtieri, 2006). La production phototrophique de biomasse algale est généralement influencée par l'intensité et la qualité de la lumière, la longueur d'onde, la source et le photopériodisme. (Nwoba *et al.*, 2019).

### **1.2.2. Hétérotrophique**

La production hétérotrophique de biomasse algale se fait en absence de lumière et en remplaçant le  $CO_2$  atmosphérique au niveau des cultures autotrophes par un carbone organique dissout dans les milieux de culture (Perez-Garcia *et al.*, 2011).

### **1.2.3. Mixotrophique**

La culture des microalgues en présence de lumière et de sources de carbone organique et inorganique, d'une manière que les activités métaboliques des microalgues hétérotrophes et photoautotrophes aient lieu simultanément (Nwoba *et al.*, 2020).

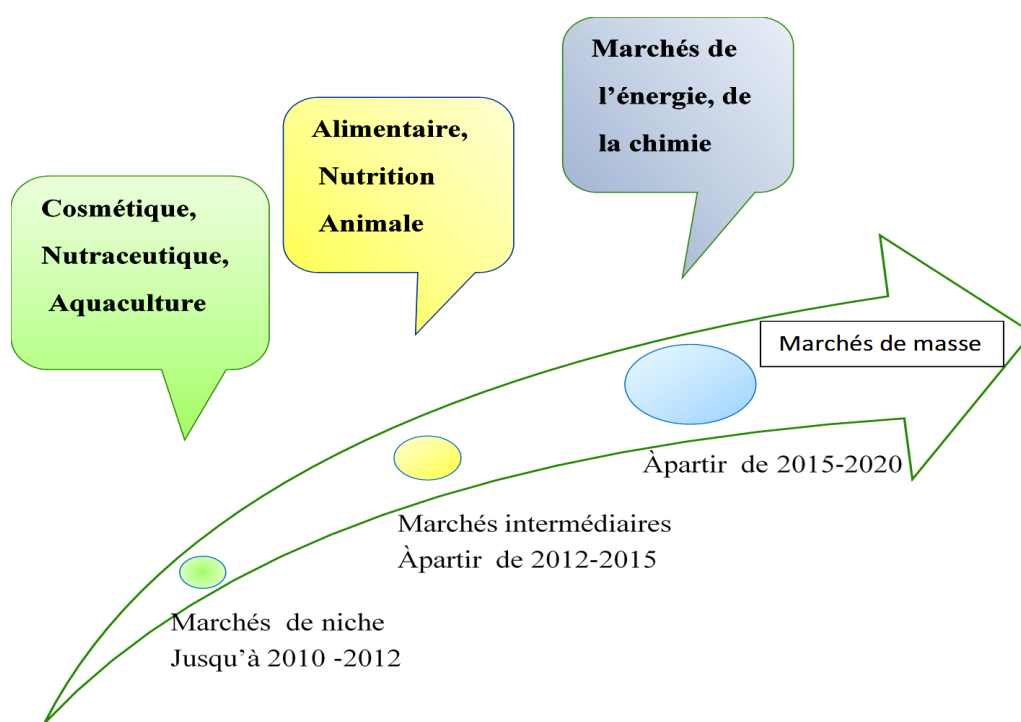
## **2. Applications biotechnologiques des microalgues**

Les Chinois étaient les premiers qui ont utilisés les microalgues avant 2000 ans, ils ont utilisés *Nostoc* pour survivre pendant la famine (Spolaore, 2006). La biotechnologie microalgale n'a commencée de se développer et suscitée la curiosité des chercheurs qu'au cours

de ces dernières décennies, ou les applications des microalgues varient de la simple production de biomasse pour l'alimentation humaine et animale à des produits de haute valeur spécifiques et pour des applications écologiques (Pulz et Gross, 2004).

Les microalgues sont une source durable de produits naturels et de molécules bioactives puisque elles ont le potentiel de produire des composés en culture qui permet la production de molécules structurellement complexes qui sont difficiles ou impossible à produire par synthèse chimique, plus de 15 000 composés issus de la biomasse algale ont été déjà identifiés (Sun *et al.*, 2015).

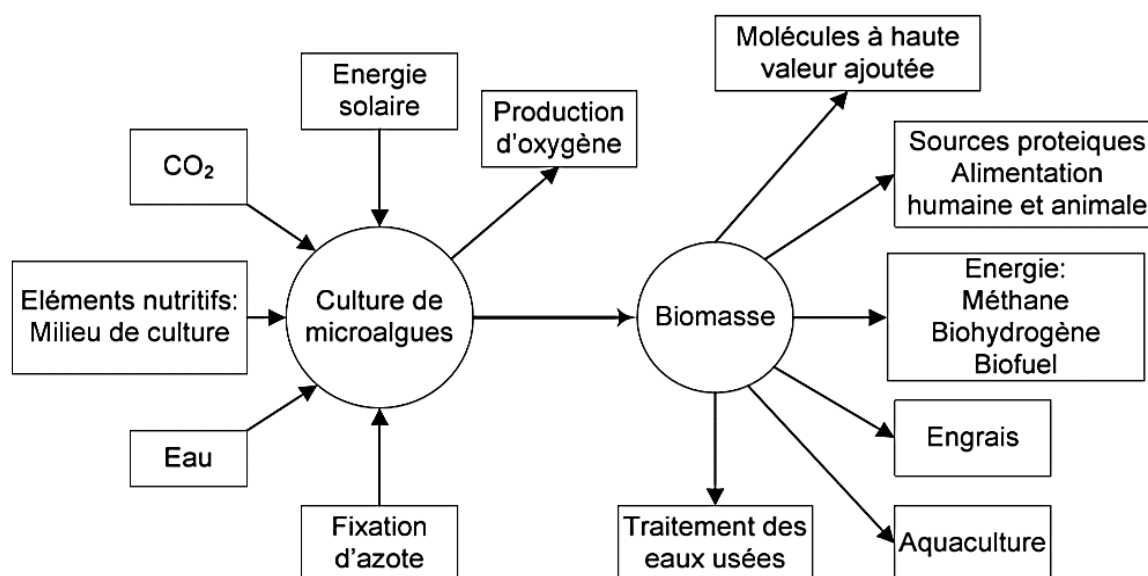
Les caractéristiques biochimiques les plus marqués des microalgues concernent les lipides, les polysaccharides, les pigments, les protéiques, les caroténoïdes, les enzymes et les molécules de haute valeur bioactives (Muller-Feuga, 1997). Ces biomolécules ont données un intérêt économique très intéressant aux microalgues, ces dernières sont aussi utilisées dans la remédiation des sols non productifs ainsi que l'épuration des eaux usées (Gujar *et al.*, 2019).



**Figure 1.2 :** Prévisions de mise sur le marché de produits issus de microalgues à l'horizon 2020 (Titica, 2012).

On peut répartir l'utilisation biotechnologique des microalgues en trois domaines : la production de biomasse à but alimentaire, la production de biomolécules spécifiques à haute

valeur ajoutée et les applications environnementales. Le 2<sup>ème</sup> domaine s'intéresse à certains composés biochimiques microalgales dont il regroupe la majorité des applications industrielles.



**Figure 1.3** : Domaines d'application des microalgues (Celis, 2009).

## 2.1. Production de biomasse à but alimentaire

Au début des années 1950 et à cause de l'augmentation de la population mondiale et les prévisions d'une insuffisance de l'approvisionnement en protéines (compléments alimentaire), des efforts intenses ont été déployés pour la recherche de nouvelles protéines alternatives. La biomasse algale est apparue à l'époque comme un bon candidat à cette fin (Becker, 2004).

### 2.1.1. Alimentation humaine

Le secteur des microalgues connaît un développement rapide grâce à la rareté des sources de molécules alimentaires, de l'augmentation des rendements et surtout de l'état GRAS (generally recognized as safe) des composés liés aux microalgues. En raison de ce statut GRAS, les produits microalgales sont bénéfiques et autorisés dans l'industrie alimentaire (Jha *et al.*, 2017).

Aujourd'hui, les microalgues commercialisées comme aliments sains ou compléments alimentaires, sont généralement vendues sous forme de gélules, de liquide et de poudre. Les algues sont également incorporées dans les pâtes, les bonbons ou dans les boissons, etc., soit comme supplément nutritif, soit comme colorant alimentaire naturel (Becker, 2004). Les applications commerciales sont dominées par quatre souches : *Arthrospira*, *Chlorella*, *D. salina* et *Aphanizomenon flos-aquae* (Spolaore *et al.*, 2006).

La consommation de *Chlorella* comme aliment ou comme supplément alimentaire a montré une efficacité thérapeutique sur les ulcères gastrique. Des essais cliniques ont été faits activement sur beaucoup de genres de désordres tels que les blessures, la constipation, l'anémie, l'hypertension, le diabète, la malnutrition infantile et la névrose (Yamaguchi, 1996).

Ces avancées thérapeutiques et nutritionnelles sont dues à la richesse des microalgues en protéines, vitamines, polysaccharide, acides gras polyinsaturés, microéléments et fibres comestibles (Liang *et al.*, 2004).

### **2.1.2. Alimentation animale**

Il est prouvé que de très petites quantités de biomasse microalgale, presque exclusivement des genres *Chlorella*, *Scenedesmus* et *Spiruline*, peuvent affecter positivement la physiologie des animaux. En particulier un renforcement du système immunitaire des animaux. Ces effets économiques ont entraîné une augmentation significative de l'utilisation de la biomasse microalgale comme additifs alimentaires, en particulier dans la production de volaille. Le marché des aliments pour animaux de compagnie est une autre application très prometteuse pour la biomasse microalgale ou même des extraits, où ils affectent non seulement les effets de promotion de la santé, mais aussi des effets sur l'apparence externe de l'animal (beau et brillant plumage) (Pulz et Gross, 2004; Nicoletti, 2016). Les microalgues sont de plus en plus utilisées dans l'alimentation animale en raison de leur valeur nutritionnelle élevée et de leurs propriétés bénéfiques pour la santé des animaux.

L'aquaculture est l'une des applications les plus importantes des microalgues, où de nombreuses espèces sélectionnées à haute valeur nutritive sont nécessaires pour nourrir les mollusques, les crustacés, les larves de poisson et le zooplancton (Tredici *et al.*, 2009), en enrichissant ce milieu pour une meilleure alimentation aquatique. En plus de fournir des protéines (acides aminés essentiels) et de l'énergie, les microalgues fournissent d'autres nutriments clés tels que les vitamines, les pigments et les stérols, qui sont transférés par la chaîne alimentaire (Brown, 2002). Il convient de noter que l'utilisation des microalgues dans l'alimentation animale est en constante évolution et fait l'objet de recherches et de développements continus. Les avantages nutritionnels et les effets sur la santé des animaux peuvent varier en fonction du type de microalgues utilisées et de leur composition spécifique. Il est important de garantir la qualité et la sécurité des microalgues utilisées dans l'alimentation animale, en veillant à ce qu'elles soient cultivées dans des conditions appropriées et qu'elles ne contiennent pas de contaminants indésirables (Barsanti et Gualtieri, 2006).

## **2.2. Production de biomolécules spécifiques à haute valeur ajoutée**

Alors que les applications alimentaires des microalgues proviennent en général des habitudes ancestrales chez les populations sujettes à la famine, la synthèse de biomolécules spécifiques à haute valeur ajoutée est beaucoup plus récente. Ces derniers sont utilisés en plusieurs domaines dont le domaine pharmaceutique, cosmétique et énergétique.

Les métabolites secondaires extraits des plantes ont été profondément utilisés dans les secteurs de la santé et de l'agriculture. Les rendements moindres, conjugués aux variations saisonnières des sources végétales, ont fait passer les chercheurs aux microalgues en tant que usine de production (Jha *et al.*, 2017).

### **2.2.1. Domaine pharmaceutique**

L'utilisation des microalgues pour des fins médicinales et pharmaceutiques n'est pas nouvelle, depuis 1962 les Chinois, les Japonais, les Philippins et d'autres peuples d'Asie du Sud et de l'Est ont utilisé les microalgues non seulement comme nourriture, mais aussi en médecine (Hoppe, 1979).

Hors que la recherche et l'étude proprement dite à propos des microalgues n'ont commencé que dans les années 1980 ou avant, la plupart des travaux ont porté sur les macrophytes (Borowitzka, 1995). Les microalgues ont également des applications dans le domaine pharmaceutique en raison de leurs propriétés biologiques et de leurs composés bioactifs. Les utilisations des microalgues dans ce domaine sont:

- Production de composés pharmaceutiques : les microalgues peuvent être utilisées comme plateforme de production pour la synthèse de composés pharmaceutiques. Grâce à leur capacité à accumuler des molécules bioactives, certaines microalgues peuvent être génétiquement modifiées pour produire des protéines thérapeutiques, des enzymes, des anticorps et d'autres composés d'intérêt médical.
- Production d'antibiotiques et d'antiviraux : certaines espèces de microalgues produisent naturellement des substances ayant des propriétés antibiotiques et antivirales. Ces substances peuvent être extraites et utilisées pour le développement de médicaments contre les infections bactériennes et virales.
- Anticancéreux : des études ont montré que certaines microalgues contiennent des composés ayant des activités anticancéreuses, tels que des polysaccharides, des

pigments et des extraits de microalgues. Ces composés peuvent être utilisés comme agents anticancéreux potentiels ou comme adjuvants dans le traitement du cancer.

- **Anti-inflammatoires et antioxydants** : les microalgues contiennent des composés ayant des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes. Ces propriétés peuvent être utilisées dans le développement de médicaments pour le traitement des maladies inflammatoires et des maladies liées au stress oxydatif.
- **Analgésiques** : certains extraits de microalgues ont démontré des activités analgésiques potentielles, ce qui peut contribuer au développement de médicaments pour le soulagement de la douleur.
- **Prévention et traitement des maladies métaboliques** : Certaines espèces de microalgues contiennent des composés bénéfiques pour la santé, tels que des acides gras oméga-3, des caroténoïdes et des fibres. Ces composés peuvent aider à prévenir et à traiter des maladies métaboliques telles que l'obésité, le diabète et les maladies cardiovasculaires (Person *et al.*, 2011).

De larges gammes de produits à utilisation pharmaceutique sont dérivées d'algues qui comprennent ; antimicrobiens, antioxydants, anticancéreux, antifongiques, les médicaments et les protéines thérapeutiques aussi des anti inflammatoires (Sigamani *et al.*, 2016).

Les produits pharmaceutiques issus des microalgues sont : les acides gras oméga-3, EPA, DHA, bêta-carotène et astaxanthine (Rahman, 2020).

- **Les antioxydants**

Plusieurs études ont déjà montrés que de nombreuses espèces d'algues ont contribué à la prévention des dommages oxydatifs causés par le stress oxydatif à travers le processus de récupération et la séquestration des radicaux libres (DRO) et de l'oxygène actif qui aide à la prévention du cancer.

Les antioxydants (caroténoïdes) sont la clé pour lutter contre diverses maladies, y compris les troubles chroniques, les maladies cardiovasculaires et les inflammations (Aditya *et al.*, 2016; Dhandayuthapani *et al.*, 2021).

La zéaxanthine et la lutéine sont des pigments qui ont été identifiés comme des agents protecteurs, ils renforcent le système immunitaire, prévoient les cancers et les maladies cardiaques (Demmig-Adams *et al.*, 2002).

- **Les acides gras**

DHA (acide docosahexaénoïque) est un acide gras de type  $\omega 3$  que l'on trouve dans les tissus du corps. Il s'agit d'un acide gras abondant dans la matière grise du cerveau et dans la rétine de l'œil, le DHA est un composant clé dans le tissu cardiaque aussi il a un rôle dans le mécanisme du maintien de la vision et de la mémoire (Barnathan, 2007).

En plus le DHA sont importants pour le développement correct du cerveau et des yeux chez les nourrissons aussi ils sont nécessaires pour soutenir le bon fonctionnement cardiovasculaire chez les adultes (Kroes *et al.*, 2003; Ward et Singh, 2005).

Le DHA joue un rôle dans les processus anti-inflammatoires et dans la viscosité des membranes cellulaires, il est essentiel pour le développement fœtal approprié et le vieillissement sain (Swanson *et al.*, 2012).

- **Les polysaccharides**

Les polysaccharides sulfatés dérivés de microalgues avaient montrés une activité antivirale en empêchant l'entrée de virus enveloppés tels que les virus *cytomégalo* humains, et le virus de la rougeole dans la cellule comme ils empêchent l'adsorption des virions contre le Virus *herpès simplex* (HSV-1,2) et *Varicella zoster* (Sigamani *et al.*, 2016).

Les polysaccharides algaux les plus utilisés sont :

- Alginate et fucane extraits des algues brunes utilisés contre le VIH, IAV, HBV
- Galactane extrait des algues rouges, utilisé contre le HSV-1, HSV-2, HIV-1, HIV2, DENV, HAV (Aditya *et al.*, 2016).

- **Les halogènes**

Les halogènes sont une famille d'éléments chimiques comprenant le fluor (F), le chlore (Cl), le brome (Br), l'iode (I) et l'astate (At). Les halogènes sont caractérisés par leur haute réactivité chimique et leur capacité à former des composés ioniques avec d'autres éléments. Les produits chimiques responsables des activités antibiotiques sont très répandus dans les macroalgues.

Les substances intéressantes en particulier sont les composés halogènes tels que les haloformes, les alcanes, l'alcool, les aldéhydes, les hydroquinones et les cétones (Smit, 2004).

**Tableau 1.2 :** Applications des différents produits extraits des microalgues (Chokshi *et al.*, 2017).

Produit	Microalgue	Application
Phycocyanine	<i>Spirulina platensis</i>	Alimentation saine Cosmétiques Produits pharmaceutiques
Phycoérythrine	<i>Porphyridium cruentum</i>	Agent fluorescent Recherche biomédicale Outil de diagnostic
Lutéine Astaxanthine	<i>Haematococcus pluvialis</i> <i>Botryococcus braunii</i> <i>Chlorella zofingiensis</i> <i>Chlorococcum sp.</i>	Pigments Agents anti-inflammatoires Cosmétiques Provitamines
$\beta$ -Carotène	<i>Dunaliella salina</i> <i>Vischeria stellata</i>	Pigments Colorant alimentaire Antioxydants Additifs alimentaires
Acide ascorbique (vitamine C) Biotine, $\alpha$ -tocophérol (vitamine E)	<i>Chlorella sp.</i> <i>Euglena gracilis</i>	Nutrition
Lipides	<i>Botryococcus braunii</i> <i>Chlorella sp.</i> <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <i>Nannochloropsis sp.</i> <i>Scenedesmus sp.</i>	Biodiesel
Carbohydrates	<i>Arthrospira platensis</i> <i>Botryococcus braunii</i> <i>Chlorella sp.</i> <i>Dunaliella salina</i> <i>Haematococcus pluvialis</i>	Bioéthanol Aliments Aliments pour animaux
Polysaccharides	<i>Porphyridium cruentum</i>	Agents antiviraux Lubrifiants Floculants

### 2.2.2. Domaine cosmétique

Les plantes, anciennement considérées comme matière première essentielle pour le domaine cosmétique, sont aujourd'hui concurrencées par les microalgues dont la biomasse est plus facile à obtenir grâce aux développements de la biotechnologie des photobioréacteurs (Calabro, 2016).

Les microalgues sont de plus en plus utilisées dans l'industrie cosmétique en raison de leurs propriétés bénéfiques pour la peau et les cheveux. Leur utilisation dans les produits cosmétiques peut apporter plusieurs avantages, tels que des effets hydratants, anti-âge, apaisants et revitalisants. Certaines préparations à base de biomolécules provenant des microalgues sont

déjà en cours de développement dans le domaine cosmétique dont la phycobiliprotéine, la phycocyanine et la phycoérythrine qui sont utilisées dans la production des crèmes solaires (Pulz et Gross, 2004). Les microalgues sont aussi utilisées en dermocosmétique comme anti acnéique et antibactérien (Michelet, 2011).

Il convient de noter que les microalgues utilisées en cosmétiques sont généralement cultivées en laboratoire ou dans des conditions contrôlées pour garantir leur pureté et leur sécurité. Les extraits de microalgues ou les dérivés d'ingrédients actifs de microalgues sont souvent utilisés dans les formulations cosmétiques. Cependant, il est important de souligner que chaque ingrédient cosmétique doit être évalué individuellement en fonction de sa sécurité, de sa compatibilité avec la peau et de son efficacité.

Il est recommandé de consulter les informations fournies par les fabricants de produits cosmétiques et de faire des tests de tolérance cutanée avant d'utiliser de nouveaux produits.

**Tableau 1.3** : Les espèces algales et leurs applications en cosmétique (Guleri et Tiwari, 2020).

Espèce algale	Type	Pigments	Métabolites	Applications
<i>Ulva lactuca</i>	Algue verte	Chlorophylle (a, b), $\beta$ -carotène	Acide oléique et linoléique	Antioxydants, anti-inflammatoire, antirides, agent hydratant 2017a
<i>Postelsia palmaeformis</i>	Algue brune	Chlorophylle c, Fucoxanthine		Adoucissant pour la peau, antirides, anti-inflammatoire
<i>Porphyra umbilicalis</i>	Algue rouge	Phycoérythrine	Acide linoléique	Conditionneur de peau 2017b
<i>Spirulina</i>	Cyanobactérie	Phycocyanine	Acide linoléique, phycocyanobiline, phycoérythrobiline	Anti-âge, synthèse du collagène, anti-inflammatoire, antioxydant
<i>Dunaliella salina</i>	Algue verte	Chlorophylle (a, b), $\beta$ -carotène	Acides palmitique, acide linoléique, $\beta$ -cryptoxanthine	Antioxydants, agent lissant

### **2.2.3. Domaine énergétique**

Les microalgues représentent une alternative importante permettant la production de biomasse sans déforestation ni compétition avec les terres arables ce qui rendent leur exploitation moins coûteuses, plus rentable et plus respectueuse à l'environnement (pas d'herbicide, pas de pesticide et l'absorption du CO<sub>2</sub>).

Pour cette fin les microalgues ont suscitées un intérêt considérable en tant que matière première potentielle pour la production de biocarburants (biodiésel, bio-oil et bio hydrogène) et du bioéthanol comme alternatif des énergies d'origine fossile (Slade et Bauen, 2013).

- **Le bioéthanol**

La production de bioéthanol à partir des microalgues est une approche prometteuse pour la production de biocarburants renouvelables. Le bioéthanol est un carburant liquide produit à partir de matières premières renouvelables telles que les microalgues, qui peuvent être utilisées comme alternative aux carburants fossiles.

Les microalgues peuvent accumuler des sucres, qui peuvent être fermentés pour produire du bioéthanol (Zittelli *et al.*, 2013).

Le bioéthanol est produit à partir de la partie glucidique de la biomasse algale à travers la fermentation par les levures suivie de la distillation pour le séparer des autres produits de fermentation. Cependant, la production de bioéthanol à partir d'algues est limitée par la teneur en glucides de la biomasse algale (généralement 20% de la matière sèche) et la part des glucides qui peuvent être converties en sucres fermentables, puis en éthanol (généralement la moitié à deux tiers de la fraction de glucides) (Craggs *et al.*, 2013).

- **Le biodiesel**

La production de biodiesel à partir des microalgues est une approche prometteuse pour la production de biocarburants renouvelables. Le biodiesel est un carburant diesel produit à partir de matières premières renouvelables, telles que les microalgues, qui peuvent être utilisées comme alternative aux carburants fossiles.

L'intérêt récent des chercheurs s'est porté sur la possibilité d'utiliser les cultures d'algues comme source de lipides pour la production des biocarburants de deuxième génération tels que le biodiésel (Beardall et Raven, 2013).

Les microalgues accumulent les lipides qui peuvent atteindre jusqu'à 80 % de leur poids sec, sont généralement sous forme de triglycérides. Ces derniers peuvent être utilisés dans la production du biodiesel via la transestérification : les huiles réagissent avec un alcool (éthanol ou méthanol) afin d'obtenir des monoesters éthyliques ou méthyliques (Cantin, 2010).

Le biodiesel algale est l'un des combustibles les plus renouvelables, non toxiques et plus écologiques (biodégradable) ce que le rend avantageux (Grama *et al.*, 2014c).

- **Le bio-oil**

Le bio-oil, également appelé huile de pyrolyse ou huile de bioconversion, peut être produit à partir des microalgues par un processus de pyrolyse ou de bioconversion thermochimique. La pyrolyse est une technique de conversion thermique qui implique la décomposition des matières organiques en l'absence d'oxygène à des températures élevées.

La conversion thermochimique est un processus par lequel la biomasse algale en l'absence d'oxygène et à haute température peut être convertie en divers combustibles, y compris le bio-oil. Ce dernier présente une alternative aux biocarburants liquides présentant des similitudes avec l'huile de pétrole. Le processus peut être subdivisé en pyrolyse et liquéfaction thermochimique (Carlsson *et al.*, 2007). La production de bio-oil à partir des microalgues présente des avantages potentiels, notamment l'utilisation de ressources renouvelables, la réduction des émissions de gaz à effet de serre et la possibilité d'utiliser des terres non agricoles pour la culture des microalgues.

Cependant, des défis techniques et économiques subsistent, notamment l'amélioration des rendements de conversion, la gestion des déchets de la pyrolyse et la rentabilité (Grama *et al.*, 2014b).

- **Le biométhane**

La production de biométhane à partir des microalgues est une approche prometteuse dans le domaine des biocarburants renouvelables. Le biométhane est un gaz naturel produit à partir de matières organiques, telles que les microalgues, par un processus de digestion anaérobie. Le biométhane peut être produit en convertissant l'énergie cellulaire des algues en énergie chimique du méthane par la fermentation anaérobie des algues par un consortium de bactéries et d'archéobactéries (Bensalem, 2019).

La production de biométhane à partir des microalgues présente des avantages potentiels, notamment la production d'un carburant renouvelable, la réduction des émissions de gaz à effet de serre et l'utilisation de ressources non alimentaires pour la production de biocarburants.

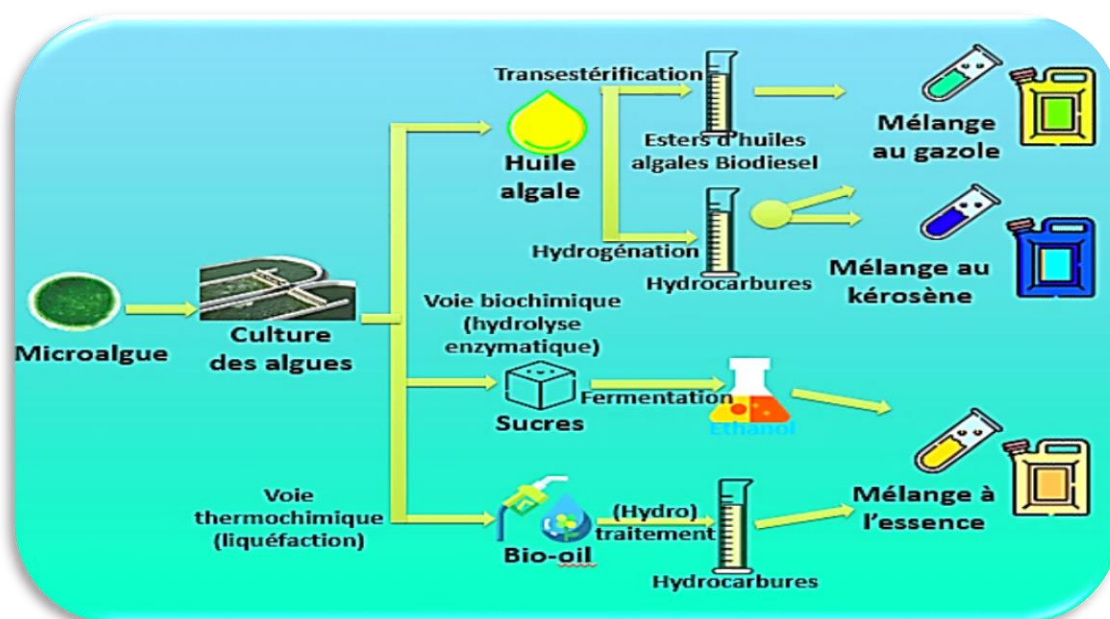
Cependant, il existe encore des défis techniques et économiques à surmonter pour rendre cette technologie viable à grande échelle, tels que l'optimisation des rendements de biométhane, la gestion des cultures de microalgues et la rentabilité du processus.

- **Le biohydrogène**

La production de biohydrogène à partir des microalgues est une voie prometteuse pour la production d'hydrogène renouvelable. Le biohydrogène est un gaz combustible qui peut être utilisé comme source d'énergie propre et durable.

Le biohydrogène est considéré comme une source d'énergie alternative prometteuse, due à son produit de combustion propre ( $H_2O$ ) et de sa forte densité d'énergie par masse (Xia *et al.*, 2016). Le biohydrogène peut être produit par les algues dans des conditions spécifiques via trois processus différents, dont la photolyse directe et indirecte, et la production de  $H_2$  à l'ATP (Carlsson *et al.*, 2007).

La recherche et le développement continus dans ce domaine visent à améliorer l'efficacité et la rentabilité de la production de biohydrogène à partir des microalgues, dans le but de fournir une source d'énergie propre et renouvelable pour l'avenir (Chader *et al.*, 2011).



**Figure 1.4** : Les biocarburants issus de microalgues.

## **2.3. Applications environnementales**

Les applications environnementales essentielles des microalgues sont le traitement des eaux usées et bien sûr la séquestration de CO<sub>2</sub> qui est un gaz à effet de serre. Les microalgues peuvent fixer efficacement le CO<sub>2</sub> à partir de différentes sources, y compris les gaz d'échappement industriels comme elles peuvent utiliser les nutriments contenus dans les eaux usées pour leur croissance (Zittelli *et al.* , 2013).

### **2.3.1. Séquestration de CO<sub>2</sub>**

Le besoin de CO<sub>2</sub> en particulier la capture et le stockage est actuellement un enjeu technologique, économique et politique mondial important et continuera d'être donc jusqu'à ce que les sources d'énergie alternatives et les transporteurs d'énergie diminuent le besoin de combustibles fossiles (Skjånes *et al.*, 2005).

Les microalgues ont la capacité de fixer le CO<sub>2</sub> en utilisant l'énergie solaire avec une efficacité 10 fois supérieure à celle des arbres (Usui et Ikenouchi, 1997). Les microalgues ont la capacité de séquestrer le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) de l'atmosphère par le biais de la photosynthèse.

Ce processus permet aux microalgues de convertir le CO<sub>2</sub> en biomasse organique, tout en libérant de l'oxygène. La séquestration du CO<sub>2</sub> par les microalgues présente plusieurs avantages potentiels :

- Réduction des émissions de CO<sub>2</sub> : en utilisant les microalgues pour capturer et stocker le CO<sub>2</sub>, il est possible de réduire les émissions de gaz à effet de serre dans l'atmosphère. Les microalgues ont une capacité de fixation de CO<sub>2</sub> beaucoup plus élevée que les plantes terrestres, ce qui en fait une option attrayante pour lutter contre le changement climatique.
- Production de biomasse : pendant la photosynthèse, les microalgues convertissent le CO<sub>2</sub> en biomasse, ce qui signifie qu'elles peuvent être utilisées pour produire des bioproduits tels que des biocarburants, des aliments pour animaux, des compléments alimentaires, des produits chimiques, des matériaux et bien d'autres. La production de biomasse à partir de microalgues peut être une alternative durable et renouvelable à l'utilisation de ressources fossiles.
- Valorisation des sous-produits : en plus de la biomasse, les microalgues peuvent produire des sous-produits valorisables tels que des pigments, des acides gras, des

protéines et des polysaccharides. Ces sous-produits peuvent avoir diverses applications dans l'industrie alimentaire, cosmétique, pharmaceutique et chimique.

- Amélioration de la qualité de l'eau : la croissance des microalgues dans les systèmes de séquestration de CO<sub>2</sub> peut également aider à améliorer la qualité de l'eau. Les microalgues absorbent les nutriments indésirables tels que l'azote et le phosphore, réduisant ainsi les risques d'eutrophisation et de prolifération d'algues nuisibles (Person *et al.*, 2011).

En théorie, les microalgues peuvent utiliser jusqu'à 9% de l'énergie solaire entrante pour produire 280 tonnes de biomasse sèche par hectare par an tout en consommant/séquestrant environ 513 tonnes de CO<sub>2</sub> (Bilanovic *et al.*, 2009). La biomasse produite elle va être exploitée dans les différentes applications précédemment citées.

### **2.3.2. Traitement des eaux usées**

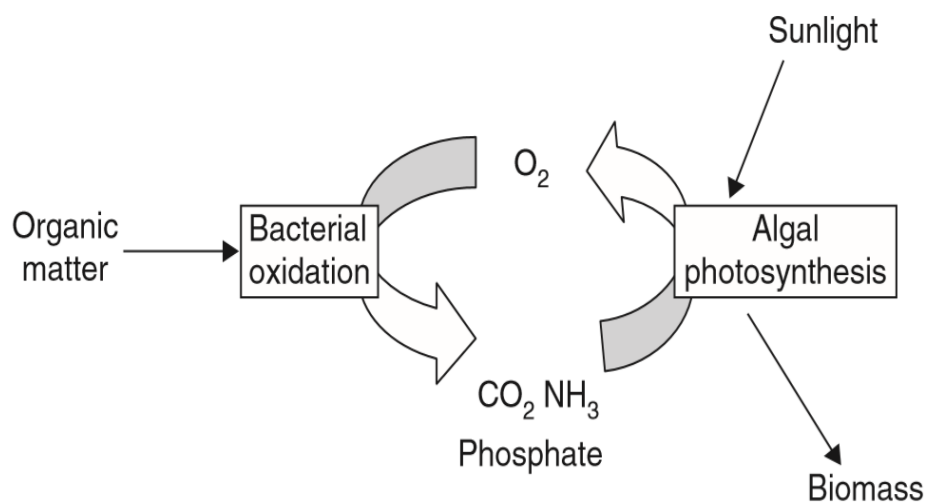
Les algues cultivées dans les eaux usées considérer comme agent purifiant en fournissant l'oxygène nécessaire à la décomposition de la charge organique par les bactéries, via la photosynthèse, également les algues sont très efficaces dans le traitement des eaux usées grâce à leurs capacité de dégrader les composés récalcitrants ainsi que la désintoxication des eaux usées industrielles (Tredici *et al.*, 2009). Certaines microalgues jouent un rôle très important dans la protection contre l'eutrophisation aquatique.

Les microalgues sont de plus en plus utilisées dans le traitement des eaux usées en raison de leurs capacités uniques à éliminer les nutriments indésirables, à produire de l'oxygène et à réduire la toxicité de l'eau. Ce processus, connu sous le nom de traitement des eaux usées par les microalgues ou l'algofiltration, présente plusieurs avantages par rapport aux méthodes traditionnelles de traitement des eaux usées.

Le traitement des eaux usées par les microalgues est réalisé selon les étapes suivantes :

- Élimination des nutriments : les microalgues ont la capacité de capturer et de consommer les nutriments tels que l'azote et le phosphore présents dans les eaux usées. Ces nutriments sont souvent responsables de la prolifération excessive d'algues dans les écosystèmes aquatiques, entraînant des problèmes environnementaux tels que l'eutrophisation. en utilisant des réacteurs à microalgues, les microalgues peuvent absorber ces nutriments, réduisant ainsi leur concentration dans l'eau traitée.

- Production d'oxygène : Pendant leur croissance, les microalgues produisent de l'oxygène par photosynthèse. Cette production d'oxygène est bénéfique pour l'environnement aquatique, car elle aide à maintenir un niveau adéquat d'oxygène dissous, favorisant ainsi la survie des organismes aquatiques.
- Réduction de la toxicité : les microalgues sont également capables de réduire la toxicité de certaines substances présentes dans les eaux usées, telles que les métaux lourds et les composés organiques toxiques. Les microalgues peuvent absorber et stocker ces substances, contribuant ainsi à la détoxification de l'eau.
- Valorisation des microalgues : une fois les microalgues utilisées pour le traitement des eaux usées, elles peuvent être récupérées et valorisées. Les microalgues peuvent être transformées en biocarburants, en engrais, en aliments pour animaux ou en produits chimiques à valeur ajoutée. Cela offre une possibilité de récupération économique et écologique.



**Figure 1.5** : Utilisation des microalgues pour le traitement des eaux usées (oxygénation photosynthétique) (Tredici *et al.*, 2009).

### 3. Physiologie cellulaire des microalgues

Les principaux paramètres pris en compte pour la culture des microalgues sont la lumière, le carbone inorganique, l'azote, le phosphore et la température.

#### 3.1. Pigments photosynthétiques

Une grande biodiversité d'algues reste à découvrir, de sorte que le potentiel de trouver de nouvelles plates-formes d'algues pour une production très attrayante et potentiellement rentable

des antioxydants reste élevé, en raison de leur capacité d'accumuler des pigments (caroténoïdes secondaires) de grande valeur dans leur biomasse, en utilisant de l'énergie solaire et le CO<sub>2</sub> comme substrat primaire au tant que organismes photosynthétiques. (Grama *et al.*, 2014a; Grama *et al.*, 2016b). La concentration des pigments peut changer d'une manière significative entre les différentes espèces de microalgues ; comme elle représente environ 1 à 14 % du poids sec des microalgues (Nwoba *et al.*, 2020).

Souvent, on fait une distinction entre les caroténoïdes primaires et secondaires : les caroténoïdes primaires sont des composants structurels et fonctionnels de l'appareil photosynthétique et sont cruciaux pour la survie.

Les caroténoïdes secondaires sont également produits par les microalgues à des niveaux significatifs, comme une réponse protectrice à divers facteurs environnementaux tels que l'exposition à la lumière de haute intensité, carence en nutriments, changements de température, ou pH faible, salinité élevée et stress oxydatif (Grama *et al.*, 2016 ; Solovchenko *et al.*, 2013).

Les caroténoïdes primaires sont associés aux membranes, les caroténoïdes secondaires sont situés dans les vésicules lipidiques dans le stroma d'un plaste ou du cytosol. Cependant, certains caroténoïdes synthétisés dans les chloroplastes peuvent être exportés dans le cytoplasme et sont par conséquent trouvés n'importe où dans la cellule (Novoveská *et al.*, 2019).

Les chlorophylles apparaissent de couleur verte, les caroténoïdes de couleurs jaune, orange et rouge, alors que les phycobilines apparaissent bleues ou rouges. Ces derniers sont des chromophores exclusivement présents chez les microalgues et les cyanobactéries (Sirois, 2013).

Les pigments sont classés suivant leurs caractéristiques chimiques et spectrales, leur structure chimique dont les chlorophylles, les caroténoïdes et les phycobilines (chez les algues et les cyanobactéries)

La variation de la composition en caroténoïdes chez les microalgues pourrait être due la présence ou l'absence de gènes et de voies de caroténogenèse, ainsi qu'aux différentes caractéristiques des enzymes spécifiques (Takaichi et Mochimaru, 2007).

- **La chlorophylle**

La chlorophylle est abondante dans la nature et, en raison de son rôle important dans l'absorbance de lumière lors de la photosynthèse, elle est essentielle à la survie de la faune et

la flore. La chlorophylle absorbe sélectivement la lumière dans les régions rouge et bleue et émet donc une couleur verte (Hosikian *et al.*, 2010). La chlorophylle est un pigment vert essentiel à la photosynthèse, le processus par lequel les plantes et certains autres organismes convertissent l'énergie lumineuse en énergie chimique pour produire des hydrates de carbone à partir du dioxyde de carbone et de l'eau.

Elle est présente dans les chloroplastes des cellules végétales, où se déroule la photosynthèse. La chlorophylle joue un rôle central dans la capture de l'énergie lumineuse nécessaire à la photosynthèse. Elle absorbe principalement la lumière bleue et rouge, réfléchissant la lumière verte, ce qui donne aux plantes leur couleur verte caractéristique. Les deux formes les plus courantes de chlorophylle sont la chlorophylle a et la chlorophylle b, qui se différencient par leur structure chimique (Grama *et al.*, 2016a).

La chlorophylle est un pigment liposoluble (hydrophobe) à faible polarité qui est présente dans les légumes, les fruits et les microalgues comme pigment photosynthétique primaire (Chew *et al.*, 2017).

On distingue 6 classes de chlorophylles : la chlorophylle a, b, c1, c2, c3, et d. La chlorophylle est une source très riche en éléments nutritifs qui maintient une bonne santé humaine, en raison de sa ressemblance moléculaire (structure chimique) étroite avec celle de l'hémoglobine. La chlorophylle est également un pigment commercial utile : c'est le colorant naturel vert (Bai *et al.*, 2011).

La chlorophylle a des propriétés antioxydantes et antimutagènes, elle est aussi utilisée comme stimulateur de la croissance tissulaire, comme elle empêche l'envahissement bactérien et accélère le processus de guérison des plaies (Hosikian *et al.*, 2010).

### **3.2. Les caroténoïdes**

Il y a plus de 400 caroténoïdes identifiés dans les organismes vivants ; parmi ceux-ci, le  $\beta$ -carotène, l'astaxanthine, la lutéine, la zéaxanthine et le lycopène. Les caroténoïdes sont des pigments hydrophobes présents chez toutes les espèces microalgales.

Les caroténoïdes appartiennent à la classe des isoprénoides, et la majorité des caroténoïdes sont des tétraterpénoïdes avec un squelette de C<sub>40</sub> comme structure moléculaire de base. Formellement, ils peuvent être divisés en carotènes, qui sont des hydrocarbures purs, et xanthophylles, qui sont dérivés de carotènes par l'introduction des fonctions d'oxygène (Roy *et al.* 2011).

Ils agissent comme pigments secondaires pour les organismes photosynthétiques, également ils jouent un rôle important en tant qu'antioxydants et facteurs de provitamine pour les organismes non photosynthétiques qui doivent les inclure dans leur alimentation.

Les propriétés antioxydantes et colorantes des caroténoïdes leurs donnent la faveur d'être appliqués dans les domaines thérapeutiques et diététiques (Leon *et al.* , 2003). Les carotènes regroupent 5 pigments ; le  $\beta$ -,  $\alpha$ -,  $\epsilon$ -,  $\gamma$ - car otène et le lycopène. Certains caroténoïdes sont convertis en vitamine A dans l'organisme, tels que le  $\beta$ -carotène, l' $\alpha$ -carotène et la  $\beta$ -cryptoxanthine.

La vitamine A est essentielle pour de nombreuses fonctions corporelles, y compris la vision, la croissance, la reproduction et le système immunitaire.

- **$\beta$  -Carotènes (C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>)**

Le  $\beta$  carotène est le carotène le plus répandu, il est bien connu que ce dernier à l'une des plus fortes activités pro-vitamine A, cette vitamine est essentielle pour la vision et la fonction appropriée du système immunitaire. Egalement le  $\beta$ -carotène comme d'autres antioxydants, peut bloquer les radicaux libres lipidiques, mais aussi prévenir l'oxydation par la chélation des ions métalliques, récupération de l'oxygène.

En outre, l'action de  $\beta$ -carotène sur la prévention de plusieurs types de cancer, et l'athérosclérose et les maladies coronariennes ont déjà été montrés (De Jesus Raposo *et al.*, 2013). Les  $\beta$ -carotènes sont convertis en vitamine A dans l'organisme par une réaction enzymatique. La vitamine A est essentielle pour de nombreux processus biologiques, tels que la vision, la croissance, le développement cellulaire, le système immunitaire et la santé de la peau. En plus de leur rôle dans la conversion en vitamine A, les  $\beta$ -carotènes agissent également comme des antioxydants puissants, protégeant les cellules contre les dommages causés par les radicaux libres.

Ils peuvent aider à prévenir le stress oxydatif, qui est impliqué dans diverses maladies chroniques. La forme naturelle de ce pigment ( $\beta$  carotène) a un effet plus fort et facilement absorbée par le corps par rapport à la forme synthétique (Sathasivam *et al.*, 2019).

- **Lycopène**

Le lycopène est un carotène acyclique avec 11 doubles liaisons conjuguées survenant dans divers isomères géométriques. Le lycopène est l'un des pigments commerciaux et médicinales les plus importants des organismes photosynthétiques trouvés dans la nature. Il a

été utilisé comme colorant alimentaire naturel depuis de nombreuses années et ce n'est que récemment qu'il a attiré des attentions comme composant nutraceutique (antioxydant et inducteur de la communication intercellulaire et le contrôle de la croissance (Lianfu et Zelong, 2007)).

Le lycopène est un puissant antioxydant qui aide à protéger les cellules contre les dommages causés par les radicaux libres. Il est particulièrement connu pour ses effets bénéfiques sur la santé de la prostate, mais il offre également d'autres avantages potentiels pour la santé, tels que :

- Santé cardiovasculaire : des études ont suggéré que la consommation régulière de lycopène est associée à une réduction du risque de maladies cardiovasculaires, notamment les maladies coronariennes et les accidents vasculaires cérébraux. Il peut contribuer à réduire l'oxydation du cholestérol LDL ("mauvais" cholestérol) et à prévenir l'accumulation de plaque dans les artères.
- Protection contre certains types de cancer : le lycopène a été étudié pour son potentiel de prévention de certains types de cancer, notamment le cancer de la prostate, le cancer du sein, le cancer du poumon et le cancer du côlon. Ses propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires peuvent jouer un rôle dans la réduction du risque de ces maladies.
- Soutien pour la santé de la peau : le lycopène peut aider à protéger la peau contre les dommages causés par les rayons UV du soleil. Il peut contribuer à réduire les effets néfastes des rayons UV, tels que les coups de soleil, les rides et le vieillissement prématuré de la peau.
- Soutien pour la santé oculaire : le lycopène est également bénéfique pour la santé des yeux. Il peut aider à réduire le risque de développer certaines maladies oculaires liées à l'âge, telles que la dégénérescence maculaire et les cataractes.

Le lycopène est le précurseur de tous les caroténoïdes présents dans les algues (Becker, 2004).

- **Xanthophylles**

Les xanthophylles (dont fait partie la lutéine) sont une famille de caroténoïdes caractérisées par la présence de groupes de carbonyle et de carboxyle en plus des groupes hydroxyles (-OH) et/ou des époxydes qui favorisent la solubilité et ainsi à la distribution de la molécule dans les tissus (Sirois, 2013). Les xanthophylles tirent leur nom de leur couleur

caractéristique jaune (du grec "xanthos" signifiant jaune) et se distinguent des autres caroténoïdes par la présence d'une fonction oxygène dans leur structure moléculaire. Ils sont synthétisés par les organismes et peuvent également être obtenus par l'alimentation.

Les xanthophylles, en tant qu'antioxydants, jouent un rôle important dans la protection contre les dommages oxydatifs causés par les radicaux libres dans le corps. Ils peuvent aider à prévenir le stress oxydatif, qui est associé à diverses maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires, le cancer et les maladies neurodégénératives. Ils sont essentiels à la survie de l'organisme photosynthétique (Jin *et al.*, 2003).

On les trouve dans les bactéries, les microalgues et les feuilles de la plupart des plantes supérieures. Ils sont considérés comme responsables de la photo-protection en étanchant les chlorophylles triplets et les espèces réactives d'oxygène, ainsi que de la récolte légère par absorption de l'énergie lumineuse et du transfert sans rayonnement de l'énergie absorbée aux chlorophylles.

D'une manière générale, les xanthophylles sont majoritairement synthétisées dans le chloroplaste, puis exportées vers le cytoplasme, où ils s'accumulent (Huang *et al.*, 2017). En plus de leur rôle antioxydant, les xanthophylles peuvent également avoir des effets bénéfiques pour la santé, notamment la protection de la peau contre les dommages causés par les rayons UV, la modulation de l'inflammation et le soutien du système immunitaire (Grama *et al.*, 2016a).

- **Astaxanthine**

Un caroténoïde particulier, largement utilisé comme colorant alimentaire dans les industries aquacoles. L'astaxanthine est un autre caroténoïde d'origine naturelle, présent principalement dans les algues, les crustacés et les poissons.

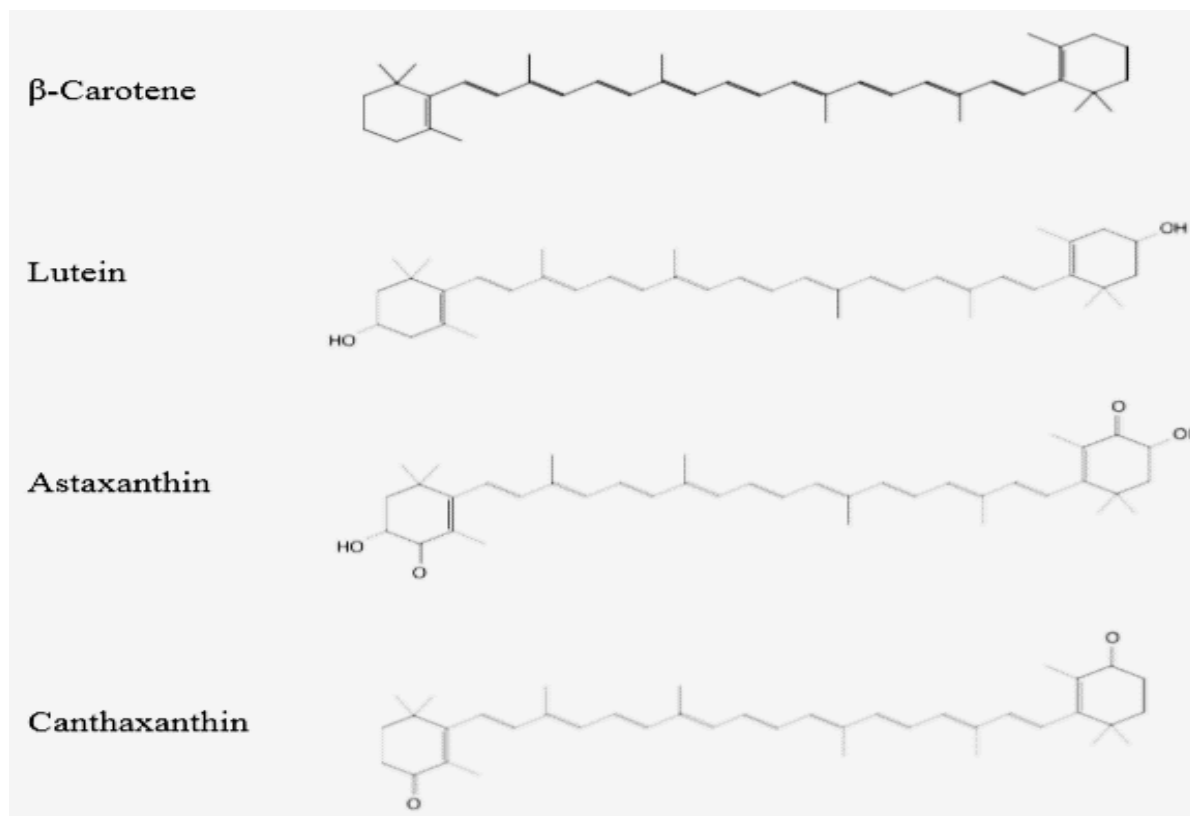
Elle est responsable de la couleur rose à rouge observée dans certains animaux marins, tels que les saumons, les crevettes et les flamants roses. L'astaxanthine est un puissant antioxydant et possède des propriétés anti-inflammatoires. Elle est souvent considérée comme l'un des antioxydants les plus puissants trouvés dans la nature. Son pouvoir antioxydant est environ 6 000 fois supérieur à celui de la vitamine C et 550 fois supérieur à celui de la vitamine E.

En outre, les recherches récentes ont montrées un grand intérêt envers les propriétés médicales de l'astaxanthine dont la protection contre les maladies chroniques telles que le cancer et d'autres maladies dégénératives.

De nombreuses études ont démontrées que l'astaxanthine peut posséder une activité antioxydante puissante, qui peut être dix fois plus forte que celle du  $\beta$ -carotène, zéaxanthine et canthaxanthine (Lu *et al.*, 2010).

Les bienfaits potentiels de l'astaxanthine pour la santé incluent :

- Protection de la peau : l'astaxanthine est capable de pénétrer les cellules de la peau et de protéger les lipides et les protéines contre les dommages causés par les radicaux libres générés par l'exposition aux rayons UV. Cela peut aider à prévenir les dommages cutanés, le vieillissement prématuré et les rides.
- Soutien pour la santé des yeux : l'astaxanthine a une affinité particulière pour les tissus oculaires, y compris la rétine et le cristallin. Elle peut aider à protéger les yeux contre les dommages oxydatifs, réduisant ainsi le risque de certaines maladies oculaires, telles que la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et la cataracte.
- Réduction de l'inflammation : l'astaxanthine possède des propriétés anti-inflammatoires qui peuvent aider à réduire l'inflammation dans le corps. Cela peut être bénéfique pour atténuer les symptômes des troubles inflammatoires, tels que l'arthrite et les maladies cardiovasculaires.
- Soutien pour la santé du cerveau : des études préliminaires suggèrent que l'astaxanthine peut avoir des effets neuroprotecteurs en réduisant le stress oxydatif et en favorisant la santé des cellules cérébrales. Cela peut avoir des implications potentielles dans la prévention des maladies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson.



**Figure 1.6 :** Structures chimiques des principaux caroténoïdes (De Jesus Raposo *et al.*, 2015).

- **Lutéine**

La lutéine est un caroténoïde, un pigment naturel de couleur jaune à orange, présent dans de nombreux aliments d'origine végétale. Elle appartient à la famille des xanthophylles et est largement reconnue pour ses propriétés antioxydantes et ses bienfaits pour la santé. La lutéine se trouve principalement dans les légumes à feuilles vertes, tels que les épinards, le chou frisé et la laitue romaine, ainsi que dans certains fruits et légumes jaunes ou orangés, tels que les courges, les carottes et les oranges.

Elle est également présente dans les jaunes d'œufs, le maïs et d'autres sources alimentaires. La lutéine est une xanthophylle jaune abondante dans la région maculaire de la rétine de l'œil. La fleur de marigold est actuellement utilisée comme une source principale de lutéine commercialisée, n'empêche que les microalgues présentent une source alternative prometteuse en raison de leur teneur plus élevée en lutéine (Chen *et al.*, 2016).

En plus de ses effets bénéfiques pour la santé oculaire, la lutéine a été associée à d'autres avantages potentiels pour la santé, notamment :

- Protection contre les dommages oxydatifs : en tant qu'antioxydant, la lutéine aide à neutraliser les radicaux libres et à réduire le stress oxydatif dans le corps, ce qui peut contribuer à la prévention de diverses maladies, y compris les maladies cardiovasculaires et certains types de cancer.
- Soutien au système immunitaire : des études suggèrent que la lutéine peut jouer un rôle dans la modulation de la réponse immunitaire et la stimulation des fonctions immunitaires, aidant ainsi à renforcer le système immunitaire.
- Protection de la peau : la lutéine peut aider à protéger la peau contre les dommages causés par les rayons ultraviolets (UV) et les radicaux libres, réduisant ainsi les signes du vieillissement cutané et favorisant une peau saine.
- Effets anti-inflammatoires : la lutéine peut avoir des propriétés anti-inflammatoires, contribuant ainsi à réduire l'inflammation chronique dans le corps et à atténuer les risques de maladies inflammatoires (Grama *et al.*, 2016a).

La lutéine est considérée comme un nutraceutique important, elle est utilisée comme additif alimentaire (colorant), drogues et dans l'industrie cosmétique. Récemment, la lutéine s'est avérée efficace contre certains cancers comme dans la prévention de la dégénérescence maculaire liée à l'âge, des cataractes, soulage les maladies cardiovasculaires. Ainsi la lutéine a attiré une grande attention par rapport à la santé humaine (Spinola et Díaz-Santos, 2020; Ma *et al.*, 2020).

### **3.3. Les phycobilines**

Les phycobilines sont des pigments photosynthétiques présents chez les cyanobactéries et les algues rouges, uniques en raison de leur particularité de se lier à certaines protéines solubles dans l'eau formant des phycobiliprotéines. Ils sont responsables du transfert de l'énergie lumineuse récoltée aux chlorophylles pour la photosynthèse. Ils sont donc également connus sous le nom de pigments secondaires de récolte de lumière dont ils facilitent l'absorption de cette dernière sur un intervalle de 450 à 655 nm longueurs d'onde (Haddad *et al.*, 2019; Bensalem, 2019).

Il existe plusieurs types de phycobilines, qui sont classées en fonction de leur couleur caractéristique :

- Phycocyanines : ce sont des phycobilines bleues qui absorbent principalement la lumière dans la gamme des longueurs d'onde bleues. Elles donnent aux algues et aux cyanobactéries une teinte bleue distincte.

- Phycoérythrine : ce sont des phycobilines rouges qui absorbent principalement la lumière dans la gamme des longueurs d'onde vertes. Elles confèrent aux organismes qui les contiennent une teinte rouge ou rose.
- Phycocyanobiline : ce sont des phycobilines bleu-vert qui absorbent la lumière dans les longueurs d'onde bleues et vertes. Elles sont généralement associées à la phycocyanine et peuvent donner une teinte bleu-vert aux organismes (Person *et al.*, 2011).

Les phycobiliprotéines sont classées en trois types selon le niveau énergétique du phycobiline (spectre d'absorption) : ceux de haute énergie ; les phycoérythrine (PE), ou phycoérythrocyanine (PEC), avec une absorption principale de 480 à 580 nm ; ceux d'une énergie intermédiaire ; les phycocyanine (PC), avec une absorption principale de 600 à 640 nm ; et en dernier ceux de faible énergie ; les allophycocyanine (APC), avec une absorption principale de 620 à 660 nm (Hu, 2019).

Les phycobilines sont des pigments importants de coloration bleue, rouge utilisés dans les industries cosmétiques et alimentaires. De plus, les phycobiliprotéines sont utilisées dans les secteurs de la santé comme antioxydants, anticancéreux, antiviraux, anti-inflammatoires, et neuroprotecteurs (Mathimani et Pugazhendhi, 2018; Nwoba *et al.*, 2020). En raison de leur fluorescence, leur photostabilité et de leur efficacité dans l'absorption moléculaire, les PBP<sub>s</sub> sont très utilisées dans les laboratoires immunologiques et cliniques de recherche comme marqueurs (Basheer *et al.*, 2020).

#### **4. La caroténogénèse**

La caroténogénèse est le processus biochimique par lequel les caroténoïdes, des pigments organiques liposolubles, sont synthétisés dans les organismes. Les caroténoïdes sont une classe de composés chimiques qui comprennent le  $\beta$ -carotène, la lycopène, la lutéine, et d'autres pigments colorés que l'on trouve couramment dans les plantes, les algues, et certains micro-organismes (Grama *et al.*, 2014b).

La voie de biosynthèse des caroténoïdes est principalement présente chez les plantes, les algues et les bactéries photosynthétiques. Le processus implique plusieurs réactions enzymatiques et des étapes clés qui convertissent les précurseurs métaboliques en caroténoïdes finaux (Grama *et al.*, 2016).

La production de caroténoïdes par les organismes photosynthétiques comme une réponse physiologique pour contrer les effets délétères du stress oxydatif intracellulaire causé par les dérivés réactifs de l'oxygène (DRO).

✓ Sous des conditions optimales de croissance, les cellules végétatives de l'algue persistent et l'algue possède des caroténoïdes normalement retrouvés chez les Chlorophytes,

✓ Sous des conditions extrêmes soit endogènes (inhibition enzymatique) ou exogènes (intensité lumineuse...), les cellules végétatives commencent à synthétiser les caroténoïdes et à les accumuler en grande quantité en dehors du thylakoïde (Sirois, 2013).

Les principales étapes de la caroténogénèse :

- Condensation des isoprénoïdes : les caroténoïdes sont dérivés d'unités isoprénoïdes, appelées isoprényles, qui sont des composés de base constitués de cinq atomes de carbone. Dans la première étape, plusieurs molécules d'isoprénoïdes sont condensées pour former un précurseur commun, généralement le géranyl-géranyl pyrophosphate (GGPP).
- Formation du phytoène : le GGPP est ensuite converti en phytoène par une enzyme appelée phytoène synthase. Le phytoène est une molécule incolore à 40 carbones qui sert de précurseur à la biosynthèse des caroténoïdes.
- Désaturation du phytoène : le phytoène est ensuite soumis à une série de réactions de désaturation, catalysées par des enzymes appelées désaturases, qui ajoutent des doubles liaisons aux chaînes carbonées du phytoène. Ces réactions de désaturation convertissent le phytoène en lycopène, un caroténoïde linéaire de 40 carbones qui est responsable de la couleur rouge des tomates et des pastèques.
- Modification du lycopène : le lycopène peut subir des modifications supplémentaires, telles que des réarrangements de ses doubles liaisons ou des réactions d'oxydation, catalysées par des enzymes spécifiques. Ces réactions donnent naissance à une grande variété de caroténoïdes tels que le  $\beta$ -carotène, la lutéine, la zéaxanthine et d'autres pigments colorés présents dans les plantes et les organismes photosynthétiques (Grama *et al.*, 2016a).

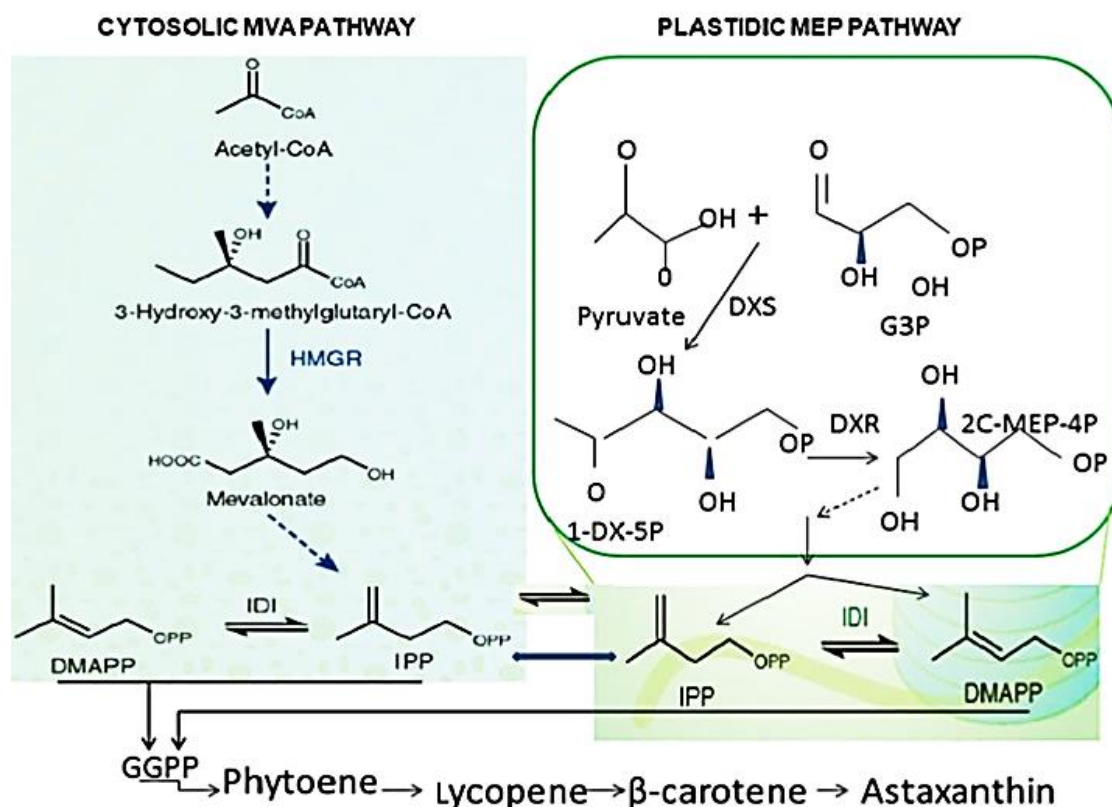
Les premières étapes de la synthèse des caroténoïdes primaires et secondaires (assemblage du squelette carboné, désaturation, cyclisation et hydroxylation) sont communes. (Solovchenko, 2013). La biosynthèse des caroténoïdes est au niveau du chloroplaste, avec quelques étapes spécifiques situées dans le cytoplasme ; elle diffère d'une espèce à l'autre ; cependant, presque toutes les microalgues ou espèces végétales photosynthétiques partagent la voie métabolique primaire commune.

Toutes les voies commencent à partir du même bloc de construction C5, isopentenyl pyrophosphate (IPP) ou son isomère, diméthylallyl diphosphate (DMAPP), produit à partir soit de l'Acétyl-CoA (la voie de l'acide mévalonique cytosolique (MVA)) ou pyruvate et G3P (le voie plastidique méthylerythritol 4-phosphate (MEP)). Bien que les deux voies mènent au même produit final (Varela *et al.*, 2015).

- **Facteurs induisant la biosynthèse des caroténoïdes secondaire**

Plusieurs études ont indiqué que la biosynthèse des caroténoïdes secondaire peut être impactée par plusieurs facteurs qui sont :

- L'intensité et la qualité de la lumière
- Le déficit des éléments minéraux
- Le stress osmotique
- La température
- La présence d'une source organique (Solovchenko, 2013).

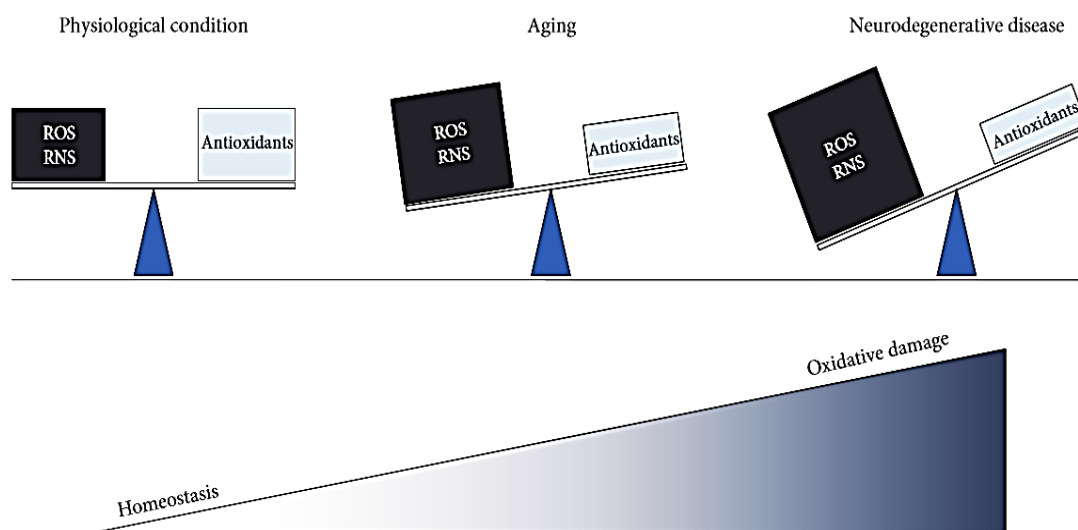


**Figure 1.7 :** Les voies de la biosynthèse des caroténoïdes (Paniagua-Michel *et al.*, 2012).

## 5. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif fait référence à un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les mécanismes de défense antioxydants de l'organisme. Les ERO, tels que les radicaux libres, sont des molécules très réactives qui peuvent endommager les composants cellulaires, y compris les lipides, les protéines et l'ADN. Normalement, l'organisme dispose de systèmes de défense antioxydants, tels que les enzymes antioxydantes (superoxyde dismutases, catalases, peroxydases) et les molécules antioxydantes non enzymatiques (glutathion, vitamine C, vitamine E, etc.), qui neutralisent les ERO ou les réparent afin de maintenir un équilibre redox stable. Cependant, lorsque la production d'ERO augmente ou que les mécanismes de défense antioxydants sont dépassés, un déséquilibre se produit, entraînant le stress oxydatif (Halliwell et Gutteridge, 2015).

Un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants dans un système biologique. Ce déséquilibre se produit en raison de la génération excessive des espèces réactives d'oxygène (ERO) et d'azote (ERN) ou du mauvais fonctionnement du système antioxydant (Halliwell et Gutteridge, 2015; Singh *et al.*, 2019).



**Figure 1.8 :** Représentation schématique du stress oxydatif chez un sujet normal, durant le vieillissement et dans le cas des maladies neurodégénératives (Cenini *et al.*, 2019).

Cependant, l'excès de la production de ERO et ERN peut être nocif, causant des modifications oxydatives défavorables aux composants cellulaires surtout les structures mitochondriales comme premières cibles des dommages induits par les ERO, des études récentes ont confirmées que les ERO causent généralement l'affaiblissement des fonctions

cellulaires à travers l'oxydation de molécules biologiques telles que les lipides, les protéines et l'ADN (Daenen *et al.*, 2019; Cenini *et al.*, 2019).

### **5.1. Espèces réactives d'oxygène (ERO)**

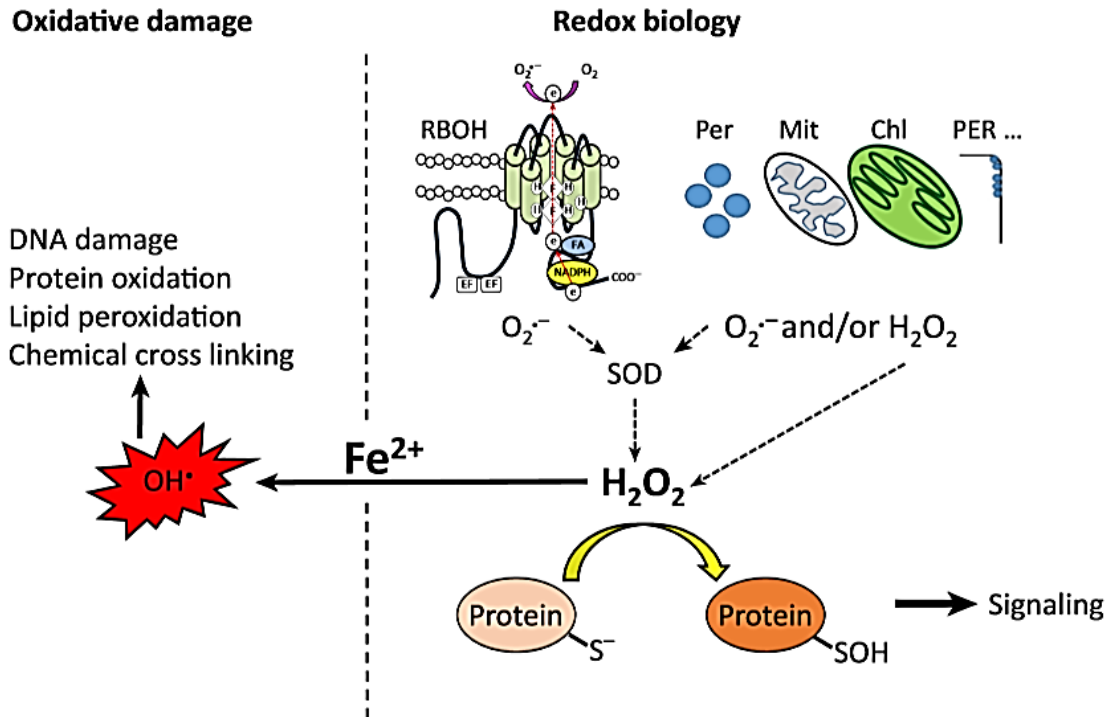
ERO un terme générique pour un large éventail de dérivés de l'oxygène moléculaire qui sont un attribut ordinaire de la vie aérobie, ils sont connue avec leurs cycle de vie court (Sies., et Jones, 2020).

Les espèces réactives d'oxygène sont normalement présentes lors du métabolisme cellulaire normal et sont essentielles dans le maintien de l'équilibre cellulaire. Dans des conditions physiologiques normales, des concentrations faibles à modérées d'ERO sont nécessaires dans des processus biologiques vitaux tels que la réponse immunitaire, l'inflammation, la prolifération cellulaire et la différenciation. Les ERO déclenchant une voie physiologique ou programmée (oxydation) pour la mort cellulaire (Mittler,2017; Cenini *et al.*, 2019).

Les ERO sont hautement réactives, donc la formation élevée de ces dernières peut endommager directement les protéines, les acides aminés et les acides nucléiques ; spécialement l'ADN.  $\text{OH}^-$  est particulièrement nocif, il provoque la dégradation des chaînes d'acides gras polyinsaturés de lipides membranaires en provoquant des lésions tissulaires (Gao *et al.*, 2017; Srinivas *et al.*, 2019). Les ERO sont la cause principale du stress oxydatif.

Ces ERO sont produits dans le cadre de processus métaboliques normaux de l'organisme, tels que la respiration cellulaire, mais leur accumulation excessive ou leur production accrue en cas de stress ou de déséquilibre peuvent entraîner un stress oxydatif et des dommages cellulaires. Les cellules disposent de systèmes enzymatiques tels que les superoxydes dismutases (SOD), les peroxydases et les catalases pour éliminer ou neutraliser les ERO et maintenir l'équilibre redox dans l'organisme (Mittler,2017).

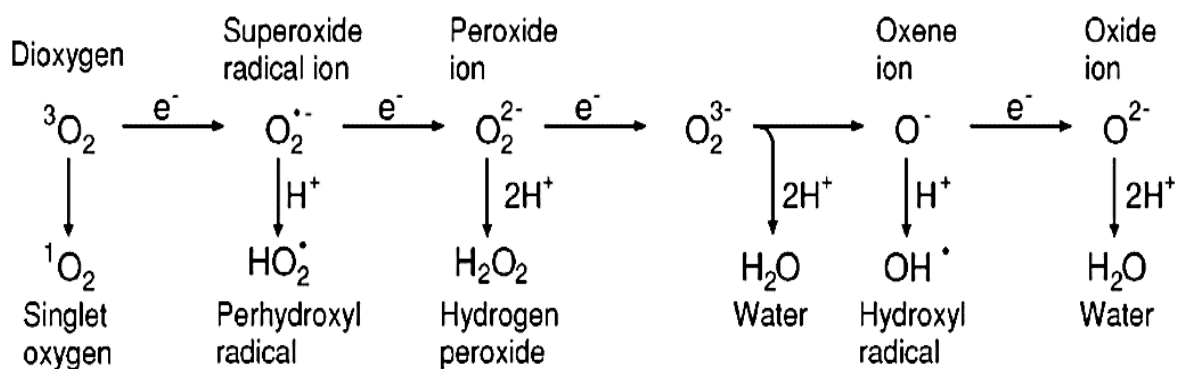
Les processus métaboliques aérobie tels que la respiration et la photosynthèse conduit évidemment à la production d'espèces réactives d'oxygène dans les peroxysomes, les mitochondries et les chloroplastes (Appel et Hirt., 2004).



**Figure 1.9 :** ERO produits par les homologues de l'oxydase de la voie respiratoire (RBOHs), les peroxysomes (Per), les mitochondries (Mit), les chloroplastes (Chl) et la cellule de la paroi liée à la peroxydase (PER) (Mittler,2017).

## 5.2. Type des ERO

Les ERO regroupent les dérivés radicalaires et non radicalaires.



**Figure 1.10 :** Génération de différents ERO par transfert d'énergie ou réduction séquentielle d'oxygène (Appel et Hirt, 2004).

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont des molécules très réactives contenant de l'oxygène et capables de causer des dommages oxydatifs dans les cellules. Voici quelques exemples d'ERO :

- Oxygène singulet ( $^1O_2$ ) : il s'agit d'un état excité de l'oxygène qui est formé lors de certaines réactions chimiques ou de l'exposition à la lumière ultraviolette. Il peut endommager les lipides, les protéines et l'ADN cellulaire.
- Superoxyde radical ( $O_2^{\bullet-}$ ) : c'est une forme réactive de l'oxygène contenant un électron non apparié. Il est principalement produit lors des réactions de transfert d'électrons dans les mitochondries et lors de réactions enzymatiques. Le superoxyde radical peut réagir avec d'autres molécules et générer d'autres ERO tels que le peroxyde d'hydrogène.
- Peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) : c'est une molécule formée lors de la décomposition du superoxyde radical ou par l'action de certaines enzymes telles que la SOD. Le peroxyde d'hydrogène peut traverser les membranes cellulaires et réagir avec des ions métalliques pour générer des radicaux hydroxyle hautement réactifs.
- Radical hydroxyle ( $\bullet OH$ ) : il s'agit de l'ERO le plus réactif et le plus dommageable. Il est formé par la réaction du peroxyde d'hydrogène avec des ions métalliques tels que le fer et le cuivre. Le radical hydroxyle peut réagir avec pratiquement toutes les biomolécules et causer des dommages importants à l'ADN, aux protéines et aux lipides cellulaires (Mittler, 2017).

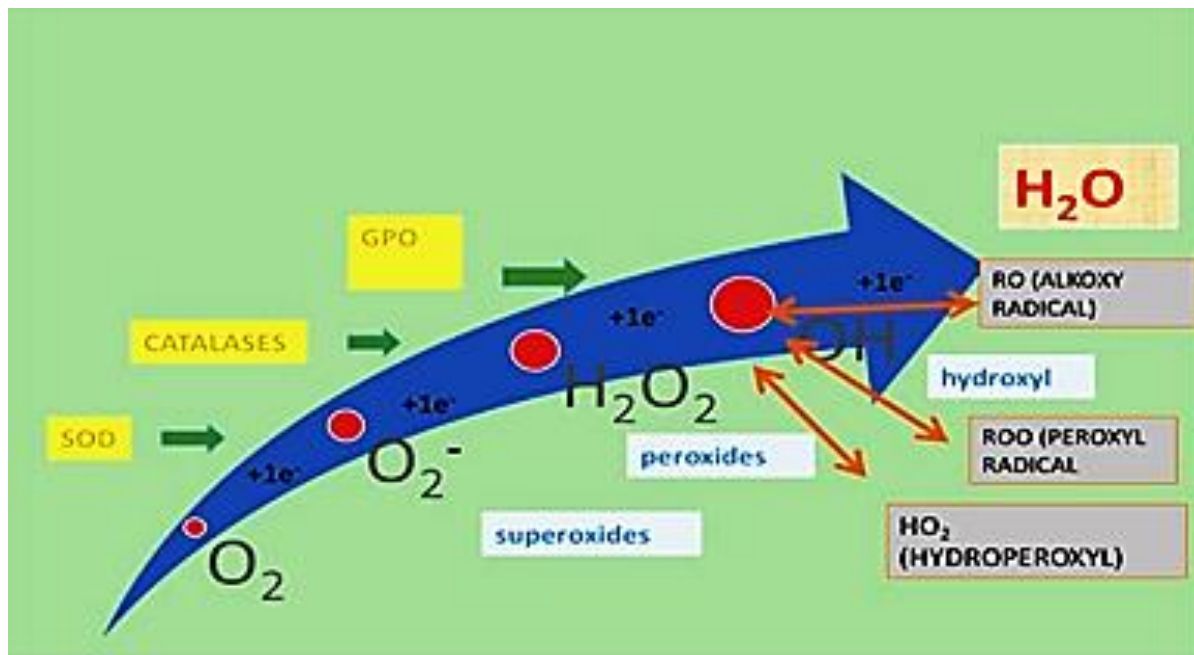
Le site de synthèse de plus de 95% des ERO est la mitochondrie. Le système de transport des électrons de la membrane interne des mitochondries produit l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) et tous ses dérivées (Munro, 2014).

## **6. Systèmes antioxydants**

Les stress abiotiques et biotiques causent une accumulation importante des ERO et pour défendre les effets délétères causés par ces dernières qui sont le résultat du stress oxydatif cellulaire, les microalgues ont développé des systèmes de défense antioxydants enzymatiques et non enzymatiques, qui s'adaptent au taux des ERO présentes. Ces antioxydants sont distribués dans les différents compartiments cellulaires (Migdal et Serres, 2011; Gao *et al.*, 2017).

### **6.1. Antioxydants enzymatiques**

Le système antioxydant enzymatique des microalgues composé de : superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathion peroxydase (GPX), ascorbate peroxydase (APX) et glutathion réductase (GR).



**Figure 1.11** : Les enzymes antioxydantes qui fonctionnent en cascade (Guleri, S., & Tiwari, 2020).

- **Superoxydes dismutase**

Les SOD<sub>s</sub> agissent comme la première ligne de défense contre les ERO à fin de protéger la cellule contre les dommages oxydatifs en catalysant la dismutation de 2 radicaux superoxyde ( $O_2^-$ ) en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et de l'oxygène ( $O_2$ ), par l'addition de 2 ions hydrogène ( $H^+$ ) (Appel et Hirt, 2004; Cirulis *et al.*, 2013). La SOD est la seule enzyme capable de catalyser cette réaction, non seulement la première ligne de défense, donc elle occupe une position clé dans le système antioxydant (Janknecht *et al.*, 2007).

Il existe plusieurs types de superoxydes dismutases :

- **Cu/Zn-SOD** : comme mentionné précédemment, la Cu/Zn-SOD contient des ions cuivre et zinc comme cofacteurs et se trouve principalement dans le cytosol et les organites cellulaires tels que les peroxysomes. Elle est responsable de la décomposition du superoxyde dans ces compartiments cellulaires.
- **Mn-SOD** : la Mn-SOD contient un cofacteur manganèse et est localisée principalement dans les mitochondries, où elle protège ces organites des espèces réactives de l'oxygène produites lors de la respiration cellulaire.
- **Fe-SOD** : la Fe-SOD utilise un cofacteur fer et se trouve dans diverses localisations cellulaires, telles que le cytosol, les mitochondries et les chloroplastes chez les plantes. Elle joue un rôle dans la décomposition du superoxyde dans ces compartiments.

- **Ni-SOD** : la Ni-SOD est présente dans certaines bactéries et utilise un cofacteur nickel pour décomposer le superoxyde (Qi *et al.*, 2019).

La Cu/Zn-SOD se trouve souvent chez les organismes eucaryotes mais La Fe-SOD et la Mn-SOD sont généralement utilisées par les organismes procaryotes (Qi *et al.*, 2019). Les algues possèdent trois types de SOD avec différents groupes métalliques prosthétiques.

- **Fe-SOD**

La Fe-SOD (Superoxyde dismutase fer) est une enzyme antioxydante présente chez de nombreux organismes vivants. Elle joue un rôle essentiel dans la protection des cellules contre les espèces réactives de l'oxygène, en particulier le superoxyde radical ( $O_2^{\bullet-}$ ). L'isoforme présent chez la majorité des algues, le chloroplaste est le site officiel des Fe-SOD, elles sont considérées comme le principal piègeur d' $O_2$  dans les chloroplastes (Pinto *et al.*, 2003 ; Guleri et Tiwari, 2020).

La Fe-SOD peut se trouver dans différents compartiments cellulaires, tels que le cytosol, les mitochondries et les chloroplastes (chez les plantes). La localisation de la Fe-SOD dépend du type de cellule et de ses besoins spécifiques en termes de protection antioxydante (Pinto *et al.*, 2003).

- **Mn-SOD**

La Mn-SOD (Superoxyde dismutase manganèse) est une enzyme antioxydante présente chez de nombreux organismes vivants. Elle joue un rôle essentiel dans la protection des cellules contre les espèces réactives de l'oxygène, en particulier le superoxyde radical ( $O_2^{\bullet-}$ ). Les Mn-SOD sont considérées comme une forme évolutive précoce des SODs (Pinto *et al.*, 2003).

L'isoforme MnSOD se trouve dans les mitochondries ; il est le piègeur le plus actif dans les mitochondries, on protégeant l'organisme contre l' $O_2^{\bullet-}$  formé dans la lumière du thylakoïde (Pinto *et al.*, 2003; Sannasimuthu *et al.*, 2018; Lian *et al.*, 2019 ; Tripathi et Poluri., 2021). La Mn-SOD catalyse la décomposition du superoxyde radical en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et en oxygène moléculaire ( $O_2$ ). Cette réaction permet de neutraliser les espèces réactives de l'oxygène, qui peuvent endommager les cellules et les tissus en provoquant le stress oxydatif (Pinto *et al.*, 2003).

- **Cu/Zn-SOD**

La Cu/Zn-SOD (Superoxyde dismutase cuivre-zinc) est une enzyme antioxydante présente chez de nombreux organismes vivants, y compris les plantes, les animaux et les microorganismes. Elle joue un rôle clé dans la protection des cellules contre les espèces

réactives de l'oxygène, en particulier le superoxyde radical (O<sub>2</sub>•-). Cu/Zn-SOD se trouve dans le cytosol, les peroxysomes et les chloroplastes (Rossa *et al.*, 2002 ; Nguyen-Deroche, 2008).

- **Catalase**

La catalase est une enzyme présente dans presque tous les organismes vivants, y compris les plantes, les animaux et les microorganismes. Elle joue un rôle essentiel dans la décomposition de l'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) en eau et en oxygène, ce qui permet de protéger les cellules contre les dommages oxydatifs causés par les espèces réactives de l'oxygène (Ighodaro et Akinloye, 2018).

La catalase (CAT) est une protéine tétramérique de 240 kilodaltons (kDa), présente dans la majorité des tissus vivants qui utilisent de l'oxygène, abondante dans les peroxysomes et peut être produite dans le chloroplaste, le cytosol et les mitochondries (Ighodaro et Akinloye, 2018; Ugya, *et al.*, 2020). La catalase est une enzyme importante pour la protection des cellules contre les dommages oxydatifs causés par l'eau oxygénée. Son activité contribue à maintenir l'équilibre redox et à prévenir le stress oxydatif dans les cellules et les tissus des organismes vivants.

La catalase est souvent utilisée comme biomarqueur de la réponse cellulaire au stress externe. Elle convertit en eau H<sub>2</sub>O et en oxygène O<sub>2</sub> le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toxique généré au cours de la β-oxydation et de la photorespiration, éliminant ainsi une partie des ERO intracellulaires. La CAT est souvent connue par son rôle complémentaire à celui initié par la SOD (Kato *et al.*, 2021; Lu *et al.*, 2021).



Dans les microalgues l'activité de la CAT est affectée par la concentration et la durée d'exposition au stress (Cirulis, J. T., Scott, J. A., & Ross, G. M. (2013)

- **Peroxydase (POD)**

La peroxydase est une enzyme qui catalyse la décomposition de l'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) en eau et en oxygène. Elle fait partie de la famille des peroxydases, qui comprend plusieurs types d'enzymes ayant des fonctions similaires mais des spécificités différentes. Les peroxydases sont une classe d'enzymes qui catalysent l'oxydation d'un substrat avec de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Danouche *et al.*, 2020).

L'action des peroxydases est essentiellement assurée au niveau du cytosol (Cirulis *et al.*, 2013). La réaction catalysée par les peroxydases consiste à convertir l'eau oxygénée en eau et en oxygène. Cela implique la réduction de l'eau oxygénée par un donneur d'électrons, qui peut être un substrat spécifique ou un cofacteur tel que le glutathion réduit ou la NADH. Les

peroxydases jouent un rôle essentiel dans la détoxification des peroxydes, y compris l'eau oxygénée, qui peuvent endommager les cellules et les tissus en induisant le stress oxydatif. En décomposant les peroxydes, les peroxydases protègent les cellules en éliminant ces espèces réactives de l'oxygène. La famille des peroxydases peut être divisée en deux grandes classes : glutathion peroxydase (GPX), ascorbate peroxydase (APX).

- **Glutathion peroxydase (GPx)**

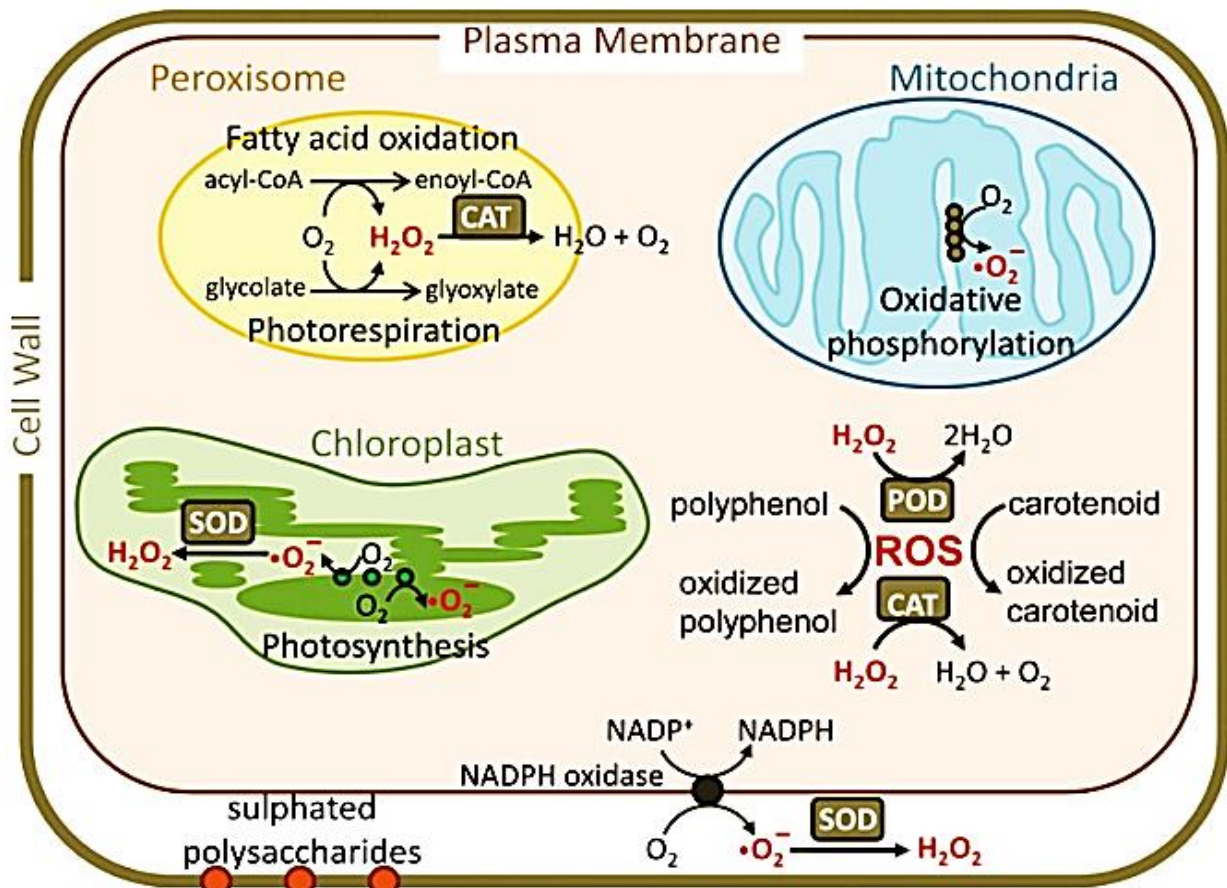
La glutathion peroxydase" (GPx) qui est une famille d'enzymes impliquées dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène, notamment les peroxydes lipidiques et l'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène). Les GPx utilisent le glutathion réduit (GSH) comme cofacteur pour neutraliser ces peroxydes et protéger les cellules contre les dommages oxydatifs. Les différentes isoformes de la glutathion peroxydase incluent GPx1, GPx2, GPx3, GPx4, GPx5, GPx6 et GPx7.

Chacune de ces isoformes a des localisations tissulaires spécifiques et des rôles distincts. La glutathion peroxydase est une enzyme antioxydante de la première ligne, responsable de la réduction de l' $H_2O_2$  par l'oxydation du glutathion en  $H_2O$  et des peroxydes lipidiques en alcools (Do Nascimento *et al.*, 2019; Ugya *et al.*, 2020). Il est important de noter que le glutathion réduit est un cofacteur essentiel pour l'activité des glutathion peroxydases. Par conséquent, un équilibre adéquat du glutathion dans les cellules est crucial pour le bon fonctionnement de ces enzymes et pour la défense contre le stress oxydatif.

- **Aascorbate peroxydase (APx)**

L'ascorbate peroxydase est une enzyme présente chez de nombreux organismes vivants, y compris les plantes, les animaux et les microorganismes. Elle fait partie du système antioxydant enzymatique et joue un rôle important dans la protection des cellules contre les dommages oxydatifs.

L'ascorbate peroxydase peut directement piéger l'oxygène libre, les radicaux hydroxyles et les superoxydes, comme il peut réduire l' $H_2O_2$  en eau (Danouche, 2020). L'ascorbate peroxydase catalyse la décomposition des peroxydes organiques et inorganiques, en particulier l'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) et les peroxydes lipidiques, en utilisant l'ascorbate comme substrat. Cette réaction permet de neutraliser les peroxydes qui peuvent endommager les cellules et les tissus. L'APX est connue comme la seule enzyme qui peut piéger l' $H_2O_2$  chloroplastique (Ben Ouada *et al.*, 2018).

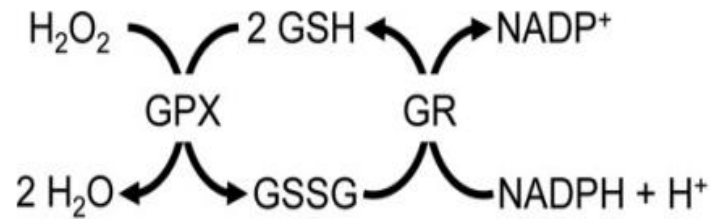


**Figure 1.12 :** Les voies cellulaires des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et leur neutralisation chez les microalgues (Cirulis *et al.*, 2013).

- **Glutathion réductase (GR)**

La glutathion réductase est une enzyme essentielle qui joue un rôle clé dans le métabolisme du glutathion, un antioxydant important présent dans les cellules de notre corps. L'enzyme glutathion réductase catalyse la réduction du glutathion oxydé (forme inactive) en glutathion réduit (forme active), en utilisant le cofacteur nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH). La GR est une enzyme antioxydante abondante dans les peroxysomes, mais elle est aussi présente au niveau des chloroplastes et des mitochondries (Romero-Puertas *et al.*, 2006).

Le GSSG produit par la réaction de la peroxydase est réduit en GSH par l'enzyme glutathion réductase, en utilisant comme cofacteur le NADPH (Ursini et Maiorino, 2013). La glutathion réductase est une enzyme essentielle pour maintenir l'équilibre redox et protéger les cellules contre le stress oxydatif. Son bon fonctionnement est crucial pour la santé cellulaire et la prévention de diverses maladies.



## 6.2. Les antioxydants non enzymatiques

Le système antioxydant non enzymatique des microalgues composé de pigments, vitamines, lipides, polyphénols, glutathion et ascorbate.

### 6.2.1. Pigments

Les pigments photosynthétiques sont des composés chimiques présents dans les cellules des organismes photosynthétiques, tels que les plantes, les algues et certaines bactéries. Ces pigments absorbent la lumière et jouent un rôle essentiel dans le processus de photosynthèse, qui permet aux organismes de convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique (Grama *et al.*, 2022a). Les pigments photosynthétiques peuvent servir d'antioxydants non enzymatiques pour prévenir les dommages dues au stress, comme les caroténoïdes (échinénone, mixoxanthophylle, et la canthaxanthine) qui sont directement responsable de la neutralisation des radicaux libres et l'oxygène libre dans les cellules algale et ensuite convertis en carotène oxydé ; ou indirectement en influençant l'expression de gènes et la traduction de protéines qui activent à leurs tour les enzymes antioxydants (Do Nascimento *et al.*, 2020; Mao *et al.*, 2021).

Ces pigments sont connus par leur rôle dans la réduction du risque de développement des maladies chroniques comme les maladies cardiovasculaires et le cancer (Do Nascimento *et al.*, 2019). Ces pigments travaillent de concert pour capter la lumière et transférer l'énergie lumineuse vers la chlorophylle, où elle est utilisée pour la production de composés organiques et la synthèse de l'adénosine triphosphate (ATP), une molécule d'énergie essentielle pour les processus cellulaires. La diversité de ces pigments photosynthétiques permet aux organismes photosynthétiques de s'adapter à différentes conditions de lumière et de maximiser l'efficacité de la photosynthèse. De plus, la variété des pigments donne aux plantes et aux algues leur gamme de couleurs caractéristiques (Grama *et al.*, 2022).

### 6.2.2. Les vitamines

Les vitamines sont des composés organiques essentiels que notre corps nécessite en petites quantités pour maintenir un fonctionnement optimal. Elles jouent un rôle crucial dans

de nombreuses fonctions physiologiques, telles que la croissance, le métabolisme, la régulation hormonale, la fonction immunitaire et la santé générale. Les microalgues sont le siège de synthèse des vitamines soit, hydrophiles B1, B2, B3, B5, B6, B8 (biotine), B9, B12 et C soit, vitamines lipophiles A et E (tocophérol) (Wang *et al.*, 2020). L' $\alpha$ -tocophérol c'est la forme biologique la plus active au tant que antioxydant, qui intervient spécifiquement dans l'empêchement de l'oxydation des membranes cellulaires (Zanella et Alam, 2020).

### **6.2.3. Les polyphénols**

Les polyphénols sont une classe de composés chimiques présents dans de nombreux aliments d'origine végétale. Ils sont caractérisés par la présence de plusieurs groupes phénoliques dans leur structure. Les polyphénols sont largement répandus dans la nature et se trouvent dans des aliments tels que les fruits, les légumes, les céréales, les épices, le thé, le vin et le chocolat. Les polyphénols ont suscité un intérêt considérable en raison de leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et de leurs effets bénéfiques sur la santé (Guleri et Tiwari, 2020).

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires, après purification ils présentent de nombreuses activités protectrices, dont la principale bioactivité est l'activité antioxydante à travers le piégeage des électrons pour rechercher les radicaux libres. L'acide caféique, l'hespéridine et la morine sont les antioxydants les plus recommandés pour les êtres humains (Dhandayuthapani *et al.*, 2021; Guleri et Tiwari, 2020). Les polyphénols ont suscité beaucoup d'intérêt en raison de leurs effets bénéfiques potentiels sur la santé, notamment dans la prévention des maladies cardiovasculaires, des maladies neurodégénératives et des cancers.

### **6.2.4. L'ascorbate**

L'ascorbate, également connu sous le nom de vitamine C, est une vitamine hydrosoluble présente dans de nombreux aliments d'origine végétale, tels que les agrumes, les baies, les kiwis, les poivrons, les épinards et les brocolis. Elle est essentiel à la santé humaine, car notre corps ne peut pas la produire et doit donc être obtenue par le biais de l'alimentation. L'ascorbate un acide organique présent dans le chloroplaste et le cytosol, ayant des propriétés antioxydants puissantes on éliminant l'excès de l' $H_2O_2$  via le cycle ascorbate-glutathion (Tripathi et Poluri, 2021). L'ascorbate est un puissant antioxydant qui aide à protéger les cellules contre les dommages causés par les radicaux libres. Les radicaux libres sont des molécules instables produites lors du métabolisme normal du corps et peuvent endommager les cellules et les tissus, contribuant ainsi au vieillissement et à certaines maladies (Tripathi et Poluri, 2021).

### **6.2.5. Les lipides**

Les lipides peuvent se trouver sous différentes formes :

**Triglycérides** : les triglycérides sont le principal type de lipides stockés dans le tissu adipeux. Ils sont également une source majeure d'énergie pour le corps.

**Phospholipides** : les phospholipides sont des composants essentiels des membranes cellulaires et jouent un rôle clé dans la structure et la fonction des cellules.

**Cholestérol** : le cholestérol est un type de lipide présent dans les membranes cellulaires et est utilisé pour la production d'hormones stéroïdes et de vitamine D.

**Acides gras essentiels** : Certains acides gras ne peuvent pas être produits par le corps et doivent être obtenus à partir de l'alimentation. Les acides gras oméga-3 et oméga-6 sont des exemples d'acides gras essentiels (Grama *et al.*, 2014b). Les lipides ont une fonction cruciale dans le stockage du carbone et de l'énergie, mais également peuvent agir comme antioxydants dans le cas du stress (Singh *et al.*, 2021). La concentration la plus élevée de lipides présente chez les microalgues, elle dépasse la concentration lipidique de n'importe quelle plante terrestre (Rahman, 2020).

### **6.2.6. Le glutathion**

Le glutathion est un tripeptide composé de trois acides aminés : la cystéine, l'acide glutamique et la glycine. Il est présent dans toutes les cellules du corps humain et est considéré comme l'un des antioxydants les plus importants. Le glutathion joue un rôle crucial dans la protection des cellules contre les dommages oxydatifs causés par les radicaux libres et autres espèces réactives de l'oxygène. Il agit comme un antioxydant en neutralisant les radicaux libres et en régénérant d'autres antioxydants tels que la vitamine C et la vitamine E. Le glutathion est le piègeur essentiel d' $H_2O_2$  et de  $O_2$ , il joue un rôle potentiel dans la neutralisation des radicaux  $OH^-$  les plus dangereux (Chokshi *et al.*, 2017).

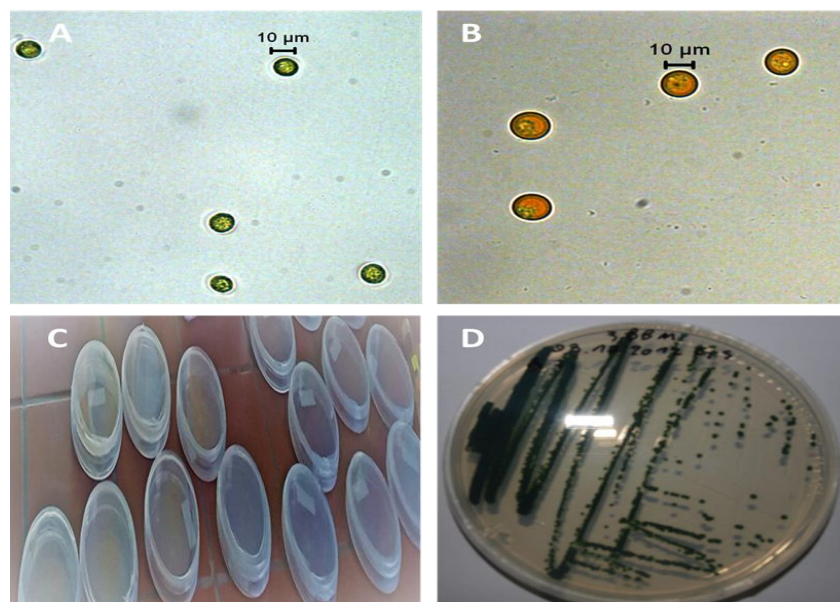
## **II. Matériel et méthodes**

## Matériel et méthodes

### 1. Souche et milieu

*D. dissociatus* MT1 a été collectée sur le terrain par les auteurs dans l'oasis de Sid Ahmed Timmi, a Adrar et identifiée comme une souche de *Dactylococcus* par une analyse de la séquence ITS (Internal Transcribed Spacer) de la région de l'ADN ribosomal nucléaire 18S-28S (Grama *et al.*, 2014a). La souche a été conservée en milieu semi solide, constitué d'un milieu 3N-BBM plus 7,5 g L<sup>-1</sup> d'agar. La formule du 3N-BBM modifié était la suivante : 8,8 mM NaNO<sub>3</sub>, 1,3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 330 μM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 430 μM NaCl, 300 μM MgSO<sub>4</sub>, 170 μM CaCl<sub>2</sub>, 12 μM EDTA, 2,2 μM Fe(III) Cl<sub>3</sub>, 2,0 μM MnCl<sub>2</sub>, 220 nM ZnCl<sub>2</sub>, 99 nM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> et 51 nM CoCl<sub>2</sub>. La stérilisation du milieu de culture a été réalisée par autoclavage pendant 20 minutes à 121 °C et 1,6 bar.

Pour éviter tout risque de contamination, la verrerie utilisée a été préalablement lavée et rincée avec de l'eau distillée. Les fioles ont été ensuite stérilisées par autoclavage (20 min à 121 °C). La culture a été initiée par une revivification de la souche à partir d'un milieu 3N-BBM solide en transférant une ansé de la culture dans des flacons en verre Duran de 500 ml contenant du 3N-BBM liquide ; la culture a été aérée par bullage d'air filtré à température ambiante pendant 21 jours.



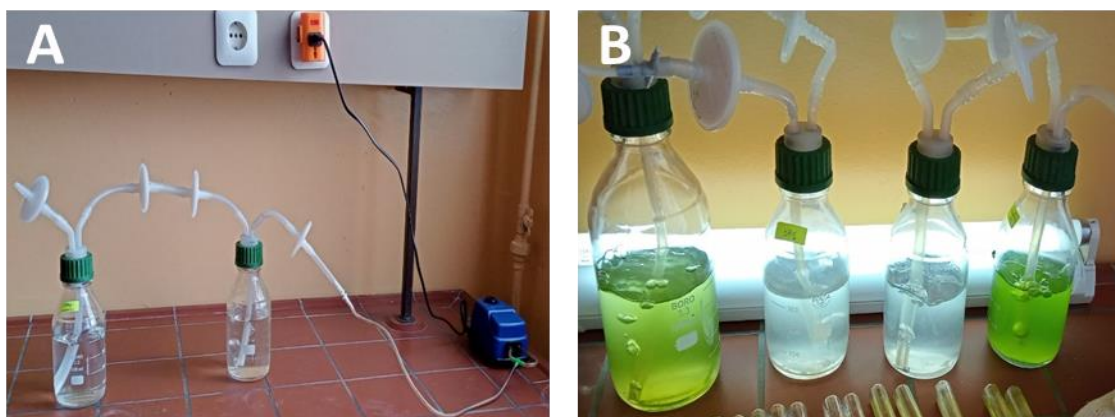
**Figure 2.1 :** A) *Dactylococcus dissociatus* MT1 observée au microscope photonique (grossissement x 40) en phase verte. B) *Dactylococcus dissociatus* MT1 observée au microscope photonique (grossissement x 40) en phase de stress. C-D) Culture de *Dactylococcus dissociatus* MT1 sur boîte de Pétri durant la phase verte.

Ces cultures stériles, en milieux liquides ont été utilisées pour inoculer les pré-cultures en phase de croissance. Un ensemencement de la même souche a été effectué en respectant les conditions d'asepsie sur des boîtes de Pétri contenant du milieu 3N-BBM solide avec une incubation à température ambiante. Entretenir la culture en ajoutant périodiquement de nouvelles boîtes de Petri avec du milieu de culture frais pour favoriser la croissance continue des microalgues. Il est important de noter que la croissance des microalgues en boîte de Petri est généralement utilisée pour des cultures de petite échelle et des études préliminaires. Pour des cultures à plus grande échelle ou pour des applications spécifiques, des systèmes de culture d'une contenance plus élevée sont utilisés.

## 2. Conditions de culture des cellules

Les cultures liquides de la suspension d'algues ont été réalisées dans des flacons en verre Duran de 500 mL avec un volume de culture de 350 mL. Les cultures ont été aérées par bullage d'air filtré à température ambiante et sous irradiation continue de  $60 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fournie par des lampes blanches froides. Des précultures en phase exponentielle ont été utilisées pour l'inoculation des cultures en phase de croissance.

Les mêmes procédures, conditions de croissance et de culture des précultures ont également été utilisées pour les cultures en phase de croissance, en combinant 50 mL de précultures avec 350 mL de 3N-BBM. Les cultures ont été faites en trois répétitions ; avec une densité initiale d'algues dans chaque flacon de  $0,21 \pm 0,09 \text{ g L}^{-1}$ . La culture en phase verte a été effectuée sur une période de six jours.



**Figure 2.2 :** Culture de *Dactylococcus dissociatus* MT1 durant la phase verte (phase de croissance)

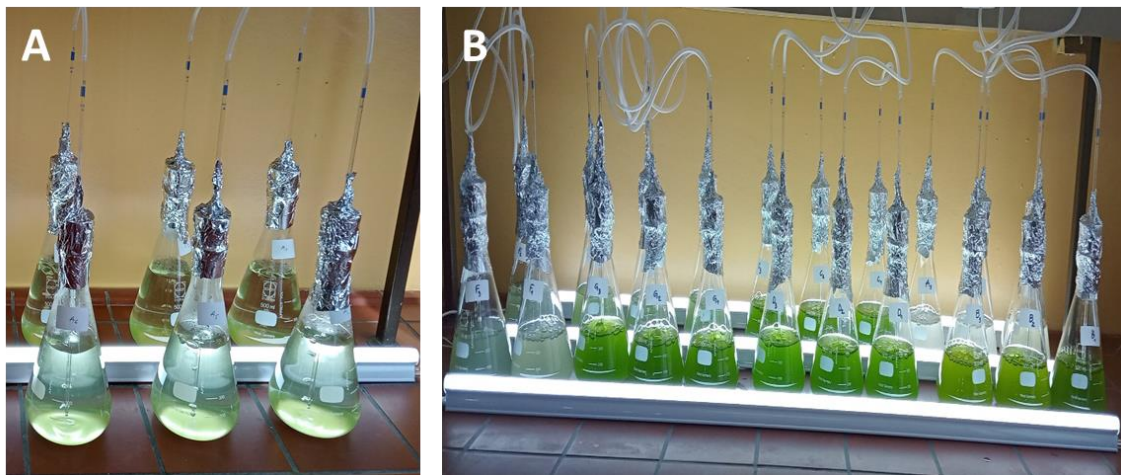
Après la phase verte, les cellules ont été séparées du milieu de culture et remises en suspension dans le milieu de stress, qui était identique au 3N-BBM mais dépourvu de nitrate.

Dans une étude précédente, la constante de demi-saturation  $E_k$  ( $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) de la souche *D. dissociatus* MT1 a été déterminée comme étant de  $110 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Grama *et al.*, 2014).

Pour cette raison, l'illumination a été doublée pour atteindre une intensité de  $220 \text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  pour la culture stressée. Dans ces conditions, un stress supplémentaire induit par la lumière est apparu en raison de la sursaturation du photosystème à des intensités lumineuses supérieures à l' $E_k$  (Grama *et al.*, 2014a).

### 3. Ajout d'inhibiteurs d'enzymes

Afin de différencier les effets d'inhibition des enzymes antioxydants sur la production de caroténoïdes, différents inhibiteurs ont été ajoutés aseptiquement à la culture au 1<sup>er</sup> jour de la culture en phase de stress, en fonction de l'enzyme ciblée. On a ajouté 2,5 mmol de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pour l'inhibition de la SOD, 68,4 mmol de NaCl pour l'inhibition de la CAT, 54  $\mu\text{mol}$  de zinc pour l'inhibition de la GPX et 10  $\mu\text{mol}$  de cuivre pour l'inhibition de l'APX.



**Figure 2.3 :** Culture de *Dactylococcus dissociatus* MT1 durant le processus de la caroténogénèse.

Une culture cellulaire sans aucun inhibiteur enzymatique a été utilisée comme témoin. Les séries d'expériences ont été étiquetées comme culture I-SOD, I-CAT, I-GPX et I-APX, pour la culture avec des inhibiteurs de superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase et ascorbate peroxydase respectivement. Les cultures ont été faites en trois répétitions avec une densité initiale d'algues dans chaque flacon de  $0,34 \pm 0,09 \text{ g L}^{-1}$ , et les expériences de culture en phase de stress ont été menées sur une période de neuf jours.

## 4. Techniques d'analyse

### 4.1. Analyses physico-chimiques

Les mesures des paramètres physico-chimiques sont effectuées à l'aide d'un multi-paramètre –Multi 3620 IDS SET G- au laboratoire de recherche. Les paramètres physico-chimiques mesurés pour chaque échantillon sont la concentration d'O<sub>2</sub> dissous, la saturation en O<sub>2</sub>, la pression, la température, la conductivité, la résistivité, le taux de sels dissous et la salinité.

A l'aide un pH-mètre de la marque JENWAY -3510 pH Meter- le pH de tous les échantillons a été mesuré.

### 4.2. Densité de la culture cellulaire

Afin de mesurer la densité de la masse cellulaire séchée dans les cellules de culture, 10 mL de la suspension cellulaire ont été initialement centrifugés dans des tubes de centrifugation en verre à 2000g pendant 10 minutes pour récolter la masse cellulaire. Le surnageant a été décanté, et les cellules ont été remises en suspension dans 30 ml d'eau distillée et centrifugées à nouveau pendant 10 minutes à 2000g. Le surnageant a ensuite été décanté, et les culots cellulaires ont été transférés dans des plats en aluminium pré-séchés et pré-pesés et séchés pendant 24 heures à 80 °C avant d'être repesés. Toutes les mesures ont été effectuées en trois répétitions (Grama *et al.*, 2014a).

### 4.3. Analyse du nitrate

L'analyse du nitrate consiste à déterminer la concentration de nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) dans les cultures. Les cellules ont été retirées du surnageant (1,00 ml de culture) par centrifugation dans des tubes Eppendorf de 2,0 ml à 5000g pendant 5 minutes. Le surnageant a été utilisé pour l'analyse des nitrates dans des cuves en quartz, et la teneur en NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a ensuite été déterminée au début et à la fin de la phase de croissance pour chaque culture en utilisant une méthode basée sur l'absorption UV (Rice *et al.*, 1998). Les mesures ont été effectuées en trois répétitions à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible de la marque JENWAY -7305 Spectrophotometer-.

### 4.4. Détermination des pigments

La détermination des pigments fait référence à la quantification des pigments présents dans un échantillon biologique, tels que les pigments photosynthétiques présents dans les microalgues, les plantes ou les cyanobactéries. Les pigments jouent un rôle important dans la

photosynthèse et peuvent être analysés pour évaluer la santé et la fonctionnalité des organismes photosynthétiques.

Les pigments sont extraits dans du méthanol à 100% après plusieurs centrifugations (2000 g, 1 min) et lavés avec de l'eau distillée. A 1,0 ml de suspension de microalgues, on ajoute 5 ml de méthanol à 100%. La DO a été mesuré avec un spectrophotomètre UV-Visible. Les quantités de chlorophylles ont été estimées en utilisant les équations ci-dessous (Lichtenthaler, 1987) ;

$$[\text{Cha}] = 16.72 A_{665.2} - 9.16 A_{652.4}$$

$$[\text{Chb}] = 34.09 A_{652.4} - 15.28 A_{665.2}$$

$$\text{T - Car} = 1000 A_{470} - 1.63 [\text{Cha}] - 104.96 [\text{Chb}] / 221$$

Où Cha, Chb sont les concentrations de chlorophylles a et b ; T - Car est la concentration de caroténoïdes totaux. La concentration des pigments est exprimée en  $\text{mg L}^{-1}$ . Les mesures ont été effectuées en trois répétitions.

#### **4.5. Analyse des lipides**

L'analyse des lipides fait référence à la quantification et à la caractérisation des différents types de lipides présents dans un échantillon. Les lipides sont des molécules organiques qui jouent un rôle essentiel dans le stockage et le transport de l'énergie, la structure des membranes cellulaires et d'autres processus biologiques. Les lipides ont été extraits suivant la procédure d'extraction modifiée de Folch et al. (1957).

L'extraction de Folch est une méthode couramment utilisée pour extraire les lipides des échantillons biologiques, tels que les tissus animaux ou les cellules. Cette méthode est basée sur l'utilisation d'un mélange de solvants organiques pour dissoudre les lipides et les séparer des autres composants de l'échantillon. plus la méthode de quantification de la sulfo-phospho vanilline (SPV) de Byreddy et al. (2016).

La teneur en lipides a été déterminée par comparaison à une courbe d'étalonnage préparée à partir de l'ajout standard d'aliquotes de 5, 10, 20 et 50 mg d'huile de soja de haute pureté provenant d'une solution d'huile de soja de  $100 \text{ mg mL}^{-1}$ . Les mesures ont été effectuées en trois répétitions.

#### 4.6. Mesure de l'activité spécifique enzymatique

La mesure de l'activité enzymatique permet de quantifier l'activité d'une enzyme dans un échantillon. Cela permet d'évaluer la présence, la concentration et la fonctionnalité des enzymes dans différents contextes biologiques.

Les cellules ont été remises en suspension dans un tampon phosphate de sodium (pH 7,0). Des échantillons de cellules ont été homogénéisés par un pulvérisateur de cellules à ultrasons à 220W pendant une durée totale de 5 min (temps d'ultrasons : 5 s ; temps de repos : 10 s). L'homogénat a été centrifugé à 12 000g pendant 15 minutes à 4 °C. Le surnageant a été conservé sous forme d'aliquote pour la quantification de la teneur des enzymes.

- **La catalase**

La catalase est une enzyme présente dans de nombreux organismes vivants, y compris les microorganismes, les plantes et les animaux. Son rôle principal est de catalyser la décomposition du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en eau ( $H_2O$ ) et en oxygène ( $O_2$ ). Cette réaction est importante car elle permet de neutraliser le  $H_2O_2$ , qui est un sous-produit toxique du métabolisme cellulaire, évitant ainsi les dommages oxydatifs aux cellules.

La catalase est une enzyme très efficace, capable de décomposer des millions de molécules de  $H_2O_2$  par seconde. Elle joue un rôle crucial dans la protection des cellules contre les dommages oxydatifs causés par les espèces réactives de l'oxygène (ERO). En plus de sa fonction de décomposition du  $H_2O_2$ , la catalase peut également oxyder d'autres substrats, tels que l'éthanol et certains composés organiques. L'activité de la catalase (CAT) peut être mesurée en utilisant la méthode de décomposition du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ).

L'activité catalase (CAT) a été déterminée par spectrophotométrie, et la décomposition de  $H_2O_2$  a été suivie par le déclin de l'absorbance à 240 nm (Rao *et al.*, 1996).

- **La superoxyde dismutase (SOD)**

La superoxyde dismutase (SOD) est une enzyme présente dans de nombreux organismes vivants, y compris les bactéries, les plantes et les animaux. Son rôle principal est de catalyser la dismutation du radical superoxyde ( $O_2^-$ ) en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et en oxygène moléculaire ( $O_2$ ). Cette réaction est importante car elle permet de neutraliser le superoxyde, qui est une espèce réactive de l'oxygène (ERO) potentiellement toxique pour les cellules.

La SOD est essentielle pour maintenir l'équilibre redox dans les cellules et protéger les composants cellulaires des dommages causés par les ERO. En effet, le superoxyde peut réagir avec d'autres molécules biologiques et générer des radicaux libres plus réactifs, provoquant des dommages oxydatifs aux protéines, aux lipides et à l'ADN.

L'activité superoxyde dismutase (SOD) a été déterminée par la méthode de Beauchamp et Fridovich (1971) en mesurant sa capacité à inhiber la réduction photochimique du nitrobluetetrazolium (NBT).

- **L'ascorbate peroxydase (APX)**

L'ascorbate peroxydase (APX) est une enzyme présente chez de nombreux organismes, y compris les plantes, les algues et certains microorganismes. Elle fait partie du système antioxydant des plantes et joue un rôle essentiel dans la neutralisation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et dans la protection contre le stress oxydatif.

L'APX catalyse la décomposition de l'hydroperoxyde d'ascorbate ( $AH_2O_2$ ) en eau ( $H_2O$ ) et en déshydroascorbate (DHA), utilisant l'ascorbate ( $AH_2$ ) comme cofacteur. Cette réaction permet de régénérer l'ascorbate, qui est une forme réduite de la vitamine C, et de neutraliser les peroxydes potentiellement toxiques.

L'activité de l'ascorbate peroxydase (APX) a été calculée par la méthode de Nakano et Asada (1981) ; en utilisant l'ascorbate comme substrat, et la diminution de l'absorbance à 290 nm a été mesurée. L'activité de la glutathion peroxydase (GPX) a été testée en utilisant du glutathion ajouté.

- **La glutathione peroxidase (GPX)**

Les enzymes GPX (Glutathione Peroxidase) sont une famille d'enzymes présentes chez de nombreux organismes, y compris les plantes, les animaux et les microorganismes. Elles font partie du système antioxydant de l'organisme et jouent un rôle important dans la neutralisation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et dans la protection contre le stress oxydatif.

Les enzymes GPX catalysent la décomposition de l'hydroperoxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en eau ( $H_2O$ ) et en oxygène ( $O_2$ ), en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme cofacteur. Cette réaction permet de neutraliser les peroxydes potentiellement toxiques et de régénérer le glutathion réduit, qui est un antioxydant majeur intracellulaire.

L'activité de la glutathion peroxydase (GPX) a été testée en ajoutant du glutathion. La concentration de glutathion réduit (GSH) a été déterminée par spectrophotométrie à l'aide d'acide dithionitrobenzoïque. spectrophotométrique avec de l'acide dithionitrobenzoïque (DTNB) à 412 nm Rijstenbil et al. (1994).

La concentration en protéines a été déterminée par le test colorimétrique standard de Bradford, avec de l'albumine de sérum bovin comme standard (Bradford, 1976). L'ensemble des activités enzymatiques a été normalisé par rapport à la concentration totale en protéines. Toutes les mesures ont été effectuées en trois répétitions.

#### **4.7 Analyse statistique**

Une analyse statistique a été réalisée avec l'application de teste de signification pour les résultats de la variation enzymatique (catalase, superoxyde dismutase, ascorbate peroxydase et la glutathione peroxidase).

### **III. Résultats et discussion**

## **Résultats et discussion**

Les microalgues sont des sources commerciales établies de produits chimiques de grande valeur tels que le  $\beta$ -carotène, l'astaxanthine, l'acide docosahexaénoïque, l'acide eicosahexaénoïque, les pigments de phycobiline et les extraits d'algues utilisés dans les cosmétiques. Les microalgues jouent également un rôle de plus en plus important dans les produits cosmétologiques, les nutraceutiques et les aliments fonctionnels.

Cette diversité évolutive et phylogénétique se traduit également par une grande diversité dans la composition chimique de ces organismes, ce qui les rend extrêmement intéressants pour la bioprospection et l'exploitation potentielle en tant que sources commerciales d'un large éventail de biomolécules. Les défis auxquels nous sommes confrontés aujourd'hui sont l'adaptation et l'amélioration des méthodes existantes, le développement de nouveaux procédés et la réduction drastique des coûts (Grama *et al.*, 2022).

La caractéristique la plus importante des microalgues est, bien sûr, leur capacité de photosynthèse, ce qui en fait des organismes prometteurs pour la culture photoautotrophe sur des milieux minéraux simples à diverses fins biotechnologiques. En fonction de l'espèce de microalgue, divers composés chimiques de grande valeur peuvent être extraits, tels que des pigments, des antioxydants, des  $\beta$ -carotènes, des polysaccharides, des triglycérides, des acides gras, des vitamines et de la biomasse, qui sont largement utilisés comme produits de base dans différents secteurs industriels (par exemple, les produits pharmaceutiques, les cosmétiques, les nutraceutiques, les aliments fonctionnels, les biocarburants) (Barsanti et Gualtieri, 2006).

Les microalgues combinent, de manière équilibrée, quelques propriétés typiques des plantes supérieures (à savoir une photosynthèse oxygénique efficace et des besoins nutritionnels simples) avec des attributs biotechnologiques propres aux micro-organismes (à savoir des taux de croissance rapides et la capacité d'accumuler ou de sécréter des métabolites primaires et secondaires).

Le nombre et la diversité des espèces d'algues offrent un tout autre domaine de recherche si l'on considère leurs applications commerciales potentielles et la biotechnologie. Bien que des progrès restent à faire dans les techniques de culture, les systèmes de production d'algues à des échelles allant de quelques litres à des volumes d'un mètre cube, dans des photobioréacteurs ou des étangs ouverts, sont désormais une réalité au niveau industriel (Person *et al.*, 2011).

- ✓ Les résultats des analyses physico-chimiques obtenus n'ont ajoutés aucune valeur à notre recherche, donc aucune corrélation n'a été trouvée.

## **1. Croissance cellulaire et caroténogénèse**

Des cultures cellulaires de *D. dissociatus* MT1 en phase de croissance verte ont été préparées pour les essais de caroténogénèse. Dans nos conditions expérimentales, la culture de *D. dissociatus* MT1 a d'abord été arrêtée après six jours afin d'éviter l'épuisement de l'azote, qui aurait engendré une phase stationnaire et l'accumulation de produits en phase stationnaire. À la fin de la culture en phase verte, la concentration de nitrate a été réduite à  $373,41 \pm 20,74 \text{ mg NO}_3^- \text{ L}^{-1}$ , ce qui représente une consommation de 40 % de la concentration initiale. Par conséquent, l'azote est l'un des nutriments critiques dans les cycles métaboliques des microalgues.

Cette première étape de culture a été réalisée afin d'obtenir une biomasse algale qui sera utilisée pour la deuxième phase de culture, à savoir la culture en phase de stress. La densité du poids sec des cellules au début de la culture était de  $0,21 \pm 0,09 \text{ g L}^{-1}$  et a augmenté jusqu'à  $0,95 \pm 0,12$ , ce qui était le résultat de la multiplication des cellules et de la croissance individuelle. Cette augmentation reflétait une croissance cellulaire caractéristique de ce stade. Cette croissance s'est également accompagnée d'une augmentation du pH. Après le premier jour de culture, le pH de la culture cellulaire est passé de  $\text{pH} = 7,2$  à  $\text{pH} = 8,8$ .

Au cours de la croissance des micro-organismes photosynthétiques, les différences de pH pendant la culture peuvent être liées principalement aux taux relatifs d'absorption et de libération de  $\text{CO}_2$  qui se produisent respectivement pendant la photosynthèse et la respiration. La libération de  $\text{CO}_2$  par la respiration acidifie le milieu avec de l'acide carbonique, et la photosynthèse consomme du  $\text{CO}_2$  et déplace ensuite l'équilibre vers un pH plus élevé.

À la fin de la phase de croissance verte, l'azote résiduel a été éliminé de la culture cellulaire par centrifugation, et la biomasse a été utilisée pour inoculer la culture en phase de stress. Les milieux de culture de stress sans azote ont été complétés avec une variété d'inhibiteurs d'enzymes antioxydants individuellement pour les enzymes ciblées.

Une culture témoin sans inhibiteur a été réalisée pour comparer les effets des différents inhibiteurs sur la culture d'algues pendant le processus de caroténogénèse. Il est largement rapporté que l'accumulation et la production de caroténoïdes secondaires peuvent se produire dans les microalgues à travers une variété de combinaisons de stress. L'évolution des principaux composants et paramètres caractérisant cette phase de caroténogénèse sont rapportés dans le **tableau 1**.

**Table 1 :** Poids sec, cha, chb, T-car et concentrations en lipides entre l'inoculation (T=0) et la fin de l'expérience (jour 9) pendant le processus de caroténogénèse pour toutes les cultures.

	Poids sec (g L <sup>-1</sup> )	Cha (mg L <sup>-1</sup> )	Chb (mg L <sup>-1</sup> )	T – Car (mg L <sup>-1</sup> )	Lipides (mg L <sup>-1</sup> )
T=0	0.34 ± 0.09	6.61 ± 0.11	3.91 ± 0.07	1.35 ± 0.13	70.35 ± 13
Contrôle	0.41 ± 0.12	2.71 ± 0.18	0.16 ± 0.07	2.08 ± 0.26	170.32 ± 25
I-SOD	0.72 ± 0.15	0.66 ± 0.11	0.14 ± 0.05	3.94 ± 0.32	308.64 ± 26
I-CAT	0.88 ± 0.12	0.76 ± 0.23	0.11 ± 0.04	5.46 ± 0.45	431.58 ± 66
I-GPX	0.57 ± 0.07	0.77 ± 0.08	0.11 ± 0.02	3.29 ± 0.21	240.69 ± 39
I-APX	0.55 ± 0.08	0.74 ± 0.21	0.13 ± 0.03	3.22 ± 0.51	234.81 ± 21

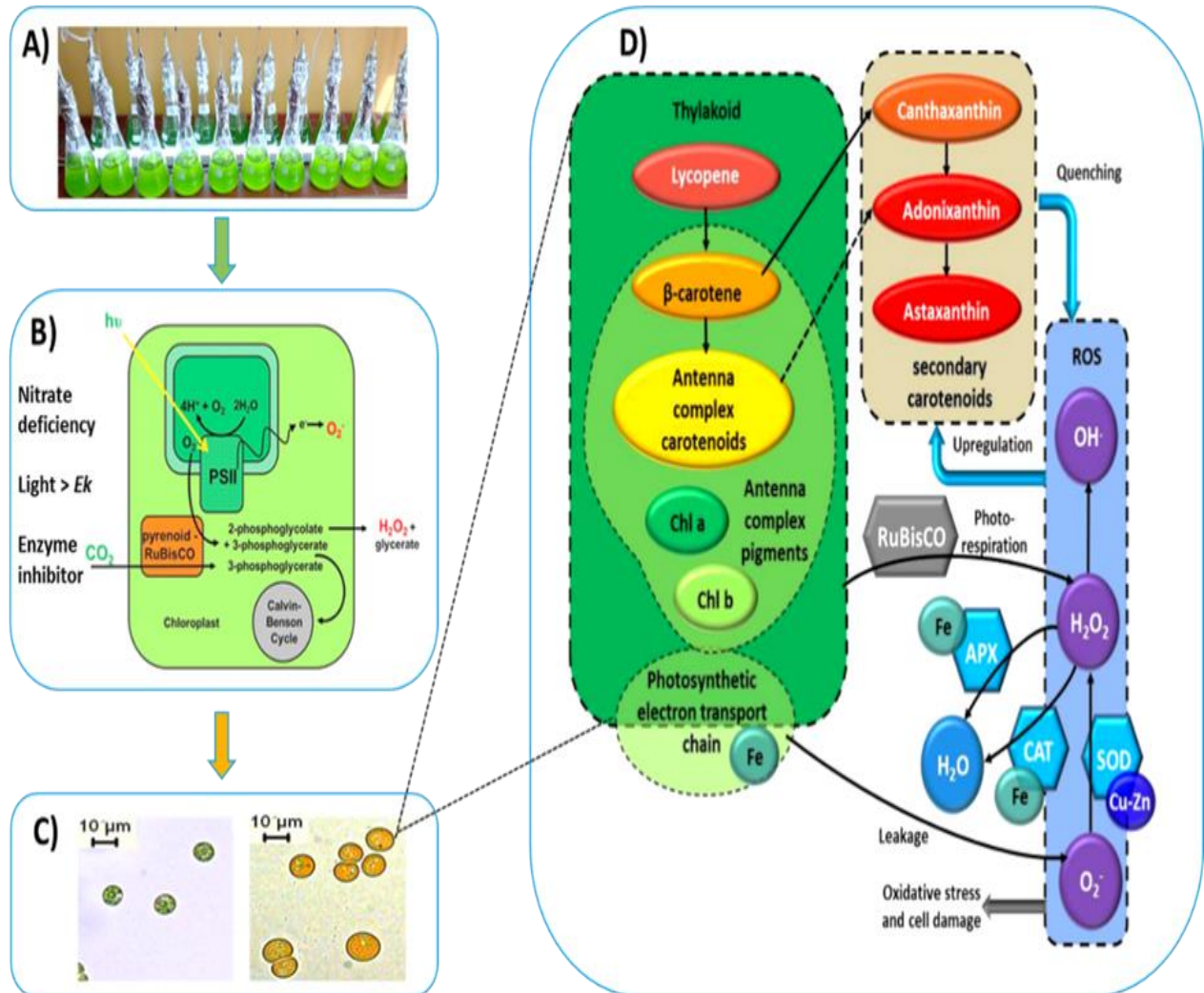
Dans notre travail, nous avons émis l'hypothèse que l'inhibition des enzymes antioxydantes, qui constituaient la première ligne de défense contre les ROS, conduirait à une accumulation plus importante de ces radicaux dans les cellules d'algues, ce qui stimulerait la cellule à utiliser une autre ligne de défense contre les radicaux, à savoir la surproduction de caroténoïdes.

Une modification morphologique et physiologique avec une dégradation progressive de la pigmentation cellulaire tout au long du processus de caroténogénèse ont été constatés par observation microscopique (**Fig. 3.1**). De nombreuses algues ont montré leur capacité à augmenter l'accumulation de caroténoïdes en cas de carence en nutriments. Une carence majeure en nutriments, comme le manque de N, P ou S, entraîne une augmentation significative de ces pigments protecteurs.

Les cellules pendant cette phase de stress de culture ont été caractérisées par un changement apparent à la fois structurel et biochimique. Après 9 jours de culture, les petites cellules vertes se sont progressivement transformées en grandes cellules orange. Ce changement de couleur est dû à la dégradation des pigments de photosynthèse, qui sont ceux qui fonctionnent dans la machinerie photosynthétique, et à l'accumulation des caroténoïdes secondaires. Les couleurs distinctives des caroténoïdes, jaune, orange et rouge, sont liées à la présence d'un certain nombre de doubles liaisons conjuguées dans une chaîne de polyène qui fonctionne comme un chromophore (Grama *et al.*, 2016).

Lorsque les cellules algales sont privées de l'un des principaux nutriments, le cycle de croissance s'arrête et la production de métabolites cellulaires se modifie. La cellule commence à produire des enzymes qui améliorent les mécanismes d'absorption du nutriment limitant. En même temps, certaines protéines et certains lipides qui ne sont pas essentiels pendant la carence

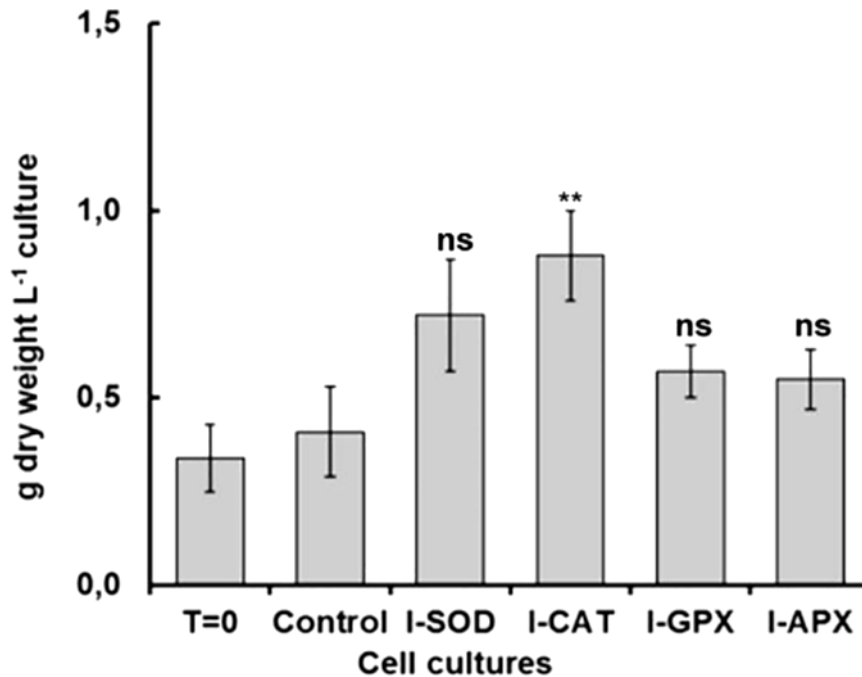
sont dégradés, ce qui est, dans de nombreux cas, une façon de libérer le nutriment limitant qui peut être utilisé pour des processus essentiels dans la cellule.



**Figure 3.1** : A) Culture de cellules stressées à T=0 (inoculation). B) Les conditions de culture utilisés pour induire la caroténogénèse. C) Observation microscopique de la morphologie cellulaire et de l'évolution des pigments cellulaires. D) Interaction proposée entre les cofacteurs (Fe, Cu), les enzymes antioxydantes catalase (CAT), superoxyde dismutase (SOD), ascorbate peroxydase (APX), les espèces réactives de l'oxygène (ROS), le photosystème et les caroténoïdes secondaires de haute valeur (canthaxanthine, astaxanthine et adonixanthine).

Comme le montre la **figure 3.2**, la densité du poids sec des cellules au début de la culture était de  $0,34 \pm 0,09 \text{ g L}^{-1}$  et a augmenté jusqu'à  $0,88 \pm 0,12 \text{ g L}^{-1}$ . La teneur la plus élevée a été obtenue dans la culture I-CAT, suivie par I-SOD, I-GPX, I-APX et enfin la culture témoin avec des concentrations de  $0,72 \pm 0,15$ ,  $0,57 \pm 0,07$ ,  $0,55 \pm 0,08$  et  $0,41 \pm 0,12 \text{ g L}^{-1}$  respectivement.

Cette augmentation de la biomasse est due à l'accumulation des différents métabolites à l'intérieur des cellules individuelles plutôt qu'à la division cellulaire.



**Figure 3.2 :** Comparaison du poids sec entre l'inoculation (T=0) et la fin de l'expérience (jour 9) du processus de caroténogénèse pour toutes les cultures. La figure représente la concentration en poids sec en  $\text{g L}^{-1}$  de la culture.

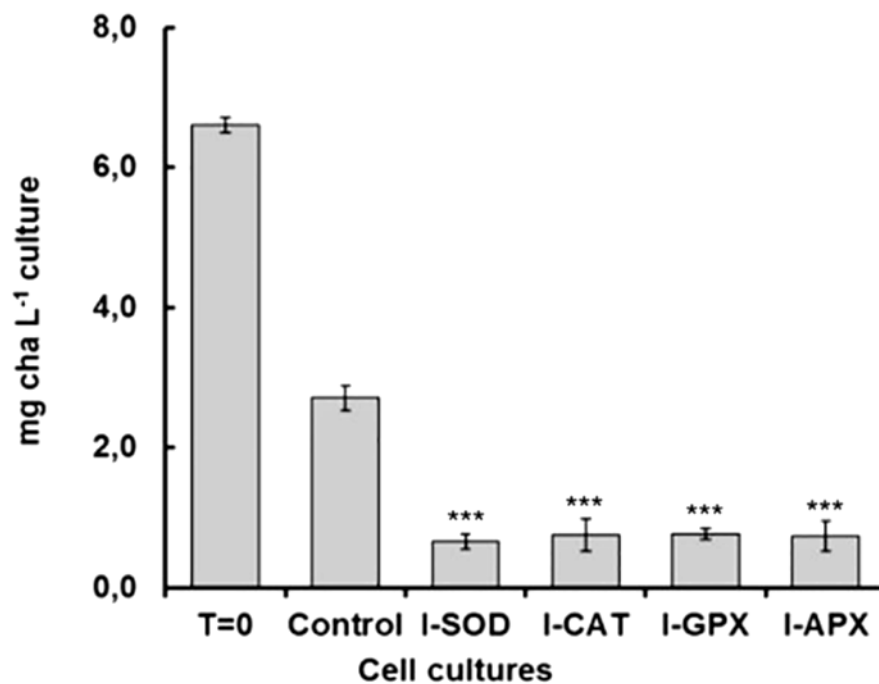
## 2. Pigments photosynthétiques

Les chlorophylles, les caroténoïdes et les phycobilines constituent la gamme de pigments produits en diverses combinaisons par les microalgues photosynthétiques. La chlorophylle a est présente dans toutes les algues et les plantes terrestres, y compris les cyanobactéries procaryotes et les prochlorophytes.

Les autres chlorophylles (b, c1, c2, d) sont des molécules accessoires qui captent la lumière et dont la répartition entre les groupes d'algues est utilisée, en partie, à des fins taxonomiques. Les chlorophylles absorbent la lumière bleue et rouge et peuvent représenter jusqu'à 2 % ou plus du poids sec cellulaire. La culture de caroténogénèse a entraîné une

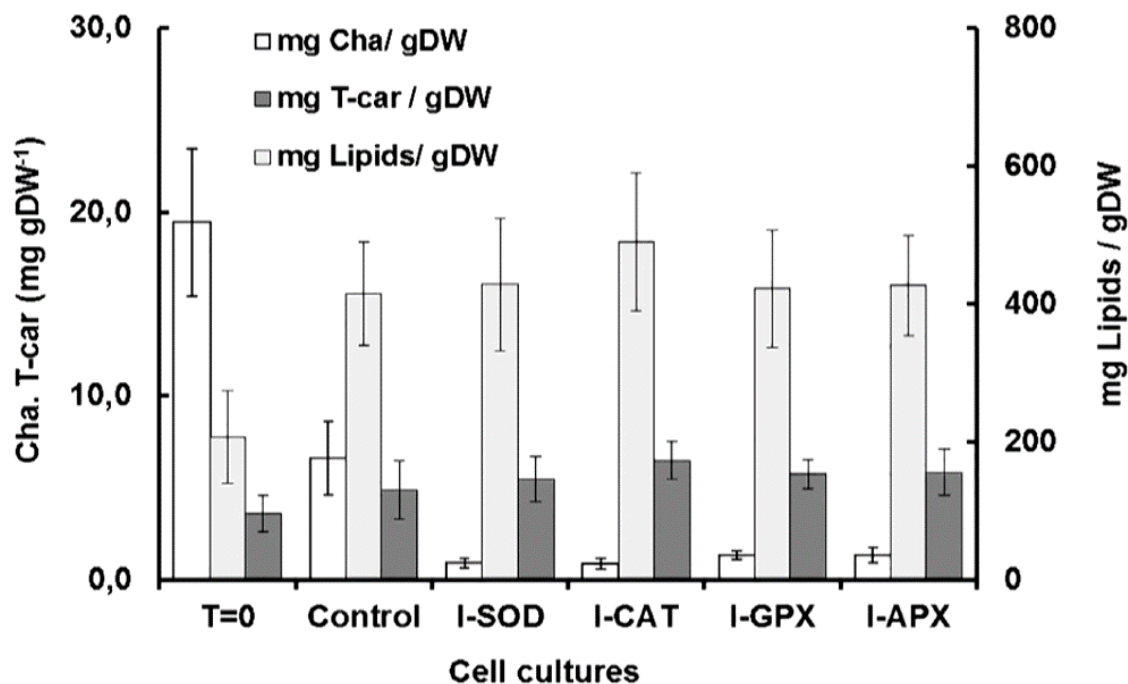
diminution des pigments photosynthétiques. Comme le montre la **figure 3.3**, le taux de chlorophylle a est passé de  $6,61 \pm 0,11 \text{ mg L}^{-1}$  au début de la caroténogénèse à  $0,76 \pm 0,23$ ,  $0,66 \pm 0,11$ ,  $0,77 \pm 0,08$  et  $0,74 \pm 0,21 \text{ mg L}^{-1}$  pour les cultures I-CAT, I-SOD, I-GPX et I-APX respectivement.

La diminution la plus faible a été obtenue pour la culture témoin avec une concentration de  $2,71 \pm 0,18$  au jour 9. Le résultat était plus remarquable lorsque la teneur en chlorophylle a était comparée à la teneur par unité de masse cellulaire sèche (**Fig. 3.4**).



**Figure 3.3** : Comparaison des concentrations de chla entre l'inoculation (T=0) et la fin de l'expérience (jour 9) du processus de caroténogénèse pour toutes les cultures. La figure représente la concentration en chlorophylle a en  $\text{mg L}^{-1}$  de la culture.

Une tendance similaire de dégradation a été obtenue pour la chlorophylle b. D'une concentration initiale de  $3,91 \pm 0,07 \text{ mg L}^{-1}$  le jour 1, cette concentration était presque nulle le dernier jour de la culture de cette phase pour toutes les cultures.



**Figure 3.4 :** Comparaison de la teneur en chla, T-car et lipides par unité de masse cellulaire sèche entre l'inoculation (T=0) et la fin de l'expérience (jour 9) du processus de caroténogenèse pour toutes les cultures.

Une dégradation de la teneur en chlorophylle (cha et chb) pour toutes les cultures a été observée, accompagnée d'une accumulation de caroténoïdes. La couleur orange est un indicateur de l'accumulation de caroténoïdes secondaires, en particulier la canthaxanthine, qui est le principal caroténoïde secondaire accumulé par cette souche d'algues au cours du processus de caroténogenèse (Grama *et al.*, 2014a).

Contrairement aux caroténoïdes primaires qui sont principalement localisés dans la membrane thylakoïde, les caroténoïdes secondaires sont principalement localisés dans les vésicules du cytosol (Park *et al.*, 2008).

Des résultats similaires ont été obtenus par plusieurs études au cours du processus de caroténogenèse. La réduction de la teneur en chlorophylle est un indicateur de stress oxydatif (di Toppi *et al.*, 2004). Dans de telles conditions, le caroténoïde agit comme une barrière cellulaire protectrice et également comme un antioxydant pour éteindre ou éliminer les radicaux libres et minimiser les dommages sur les membranes cellulaires et l'ADN (Czerpak *et al.*, 2006).

Les caroténoïdes peuvent fournir une protection contre les ROS, soit en empêchant leur formation, soit en agissant comme un antioxydant qui les inactive. L'effet d'extinction des caroténoïdes est dû à leur structure de polyène composée de doubles liaisons conjuguées

(Grama *et al.*, 2016). Il a également été suggéré que les propriétés photoprotectrices des caroténoïdes dépendaient fortement de leurs caractéristiques chimiques (Domonkos *et al.*, 2013).

Dans des conditions de croissances normales, les chlorophylles et les caroténoïdes sont produits dans les chloroplastes de manière quantitativement et qualitativement coordonnée. En conditions de stress, l'équilibre de la synthèse des pigments se déplace vers la caroténogénèse et l'ultrastructure des plastes est également modifiée, accompagnée d'une dégradation des chlorophylles (Rabbani *et al.*, 1998).

Pour la photosynthèse, les caroténoïdes et les chlorophylles sont nécessairement liés à des peptides pour former des complexes pigment-protéine dans la membrane thylakoïde. Le rapport entre les chlorophylles et les caroténoïdes est un facteur majeur dans la préservation de l'intégrité du système de photosynthèse. Par conséquent, un équilibre métabolique entre la biosynthèse et le catabolisme des caroténoïdes est nécessaire pour maintenir une physiologie de croissance normale, en particulier dans les cellules photosynthétiques (Beisel *et al.*, 2010). En outre, pour la photosynthèse, les caroténoïdes et les chlorophylles sont essentiellement liés à des peptides afin de produire des complexes pigment-protéine dans la membrane thylakoïde (Takaichi, 2011).

En outre, les caroténoïdes sont fondamentaux pour l'assemblage et la préservation du photosystème II (PSII) et peuvent contribuer aux réactions de transfert d'électrons dans ce système (Grama *et al.*, 2016).

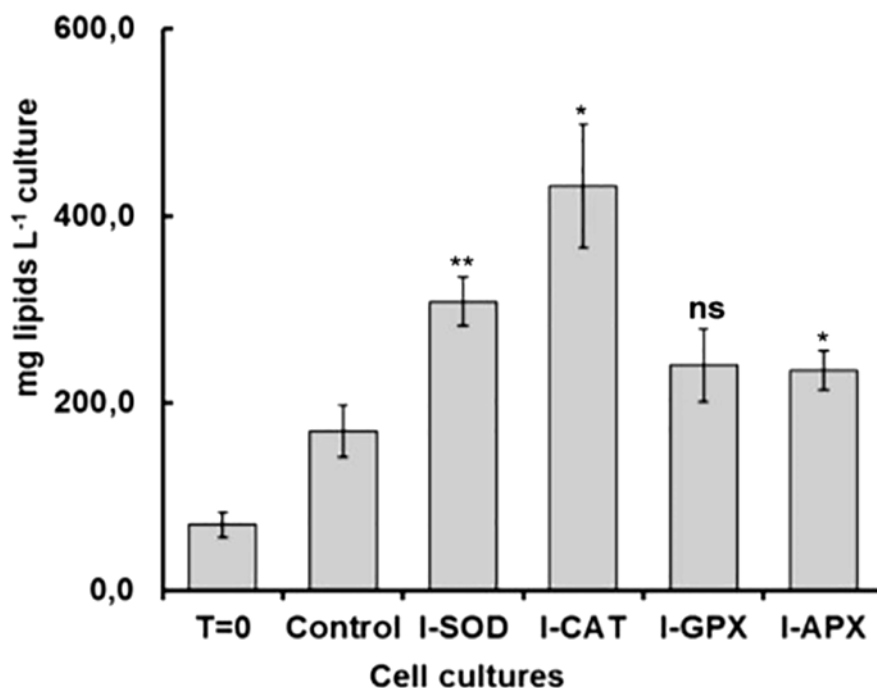
D'autres études indiquent que la perte de la teneur en chlorophylle peut être due à la peroxydation des membranes des chloroplastes (Li *et al.*, 2006). Une telle réduction des niveaux de chlorophylle se produit en cas de stress oxydatif accru chez les microalgues, ce qui entraîne une moindre libération des ROS (Cirulis *et al.*, 2013).

### **3. Augmentation du contenu en lipides**

La lipogénèse chez les microalgues est le processus par lequel ces organismes synthétisent des lipides à partir de précurseurs métaboliques tels que les sucres, les acides aminés et les acétyl-CoA. Les lipides produits par les microalgues, tels que les triglycérides, les phospholipides et les glycolipides, sont souvent riches en acides gras insaturés. La lipogénèse chez les microalgues est étroitement liée à la photosynthèse, car elle utilise l'énergie et les substrats produits pendant ce processus. Les microalgues convertissent l'énergie lumineuse en

énergie chimique sous forme d'ATP et de NADPH, qui sont nécessaires à la biosynthèse des lipides. Le principal mécanisme de la lipogénèse chez les microalgues implique l'enzyme acyl-CoA carboxylase, qui catalyse la conversion de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA. Le malonyl-CoA est ensuite utilisé dans la voie de synthèse des acides gras, qui aboutit à la formation d'acides gras à longue chaîne. Ces acides gras sont ensuite estérifiés avec des glycérols pour former des triglycérides, qui sont stockés dans des gouttelettes lipidiques à l'intérieur des cellules des microalgues. La lipogénèse chez les microalgues est influencée par divers facteurs environnementaux, tels que la disponibilité de la lumière, des nutriments et du carbone. Des conditions de stress, telles que le stress lumineux, le stress nutritionnel ou le stress thermique, peuvent également affecter la lipogénèse et entraîner des changements dans la composition et la quantité des lipides produits par les microalgues (Grama *et al.*, 2014b).

Comme le montre la **figure 3.5**, la teneur en lipides des cellules a augmenté pendant la caroténogénèse dans tous les milieux de culture. Au début de la caroténogénèse, la concentration initiale de lipides était de  $70,35 \pm 13 \text{ mg L}^{-1}$  et elle a atteint  $431,58 \pm 66 \text{ mg L}^{-1}$  au jour 9. La teneur la plus élevée a été obtenue dans la culture I-CAT, suivie par I-SOD, I-GPX, I-APX et enfin la culture témoin avec des concentrations de  $308,64 \pm 26$ ,  $240,69 \pm 39$ ,  $234,81 \pm 21$  et  $170,32 \pm 25 \text{ mg L}^{-1}$  respectivement.



**Figure 3.5** : Comparaison de la teneur des lipides entre l'inoculation (T=0) et la fin de l'expérience (jour 9) du processus de caroténogénèse pour toutes les cultures. La concentration en lipides en  $\text{mg L}^{-1}$  de la culture.

La même tendance à l'augmentation des lipides a été obtenue lorsque la teneur en lipides a été comparée à la teneur par unité de masse cellulaire sèche. Toutes les cultures avec inhibiteur enzymatique ont montré un contenu lipidique plus élevé par rapport à la culture témoin, qui ne contient pas d'inhibiteur enzymatique (**Fig.3.4**).

Une autre modification biochimique importante et une réorientation des cellules pendant la culture en phase de stress est l'accumulation de lipides. Pendant le processus de caroténogénèse, la formation de liposomes capables d'accumuler des lipides et de séquestrer les caroténoïdes secondaires est considérée comme un facteur déplaçant le flux métabolique vers la biosynthèse des caroténoïdes secondaires (Solovchenko, 2013).

En cas de stress nutritionnel, l'accumulation de lipides est accrue avec la formation de triacylglycérol (TAG) comme principal composant (Thomasz *et al.*, 2004). Bien que la formation de liposomes qui servent de dépôts de caroténoïdes secondaires puisse se produire en l'absence de biosynthèse de caroténoïdes secondaires, l'induction de la caroténogénèse n'est pas envisageable sans de telles structures (Grama *et al.*, 2016).

Dans nos conditions de culture, l'accumulation de lipides était variable dans chaque culture. La teneur la plus élevée a été obtenue dans la culture I-CAT, suivie par I-SOD, I-GPX, I-APX et enfin la culture témoin. Des résultats similaires ont été obtenus par plusieurs études au cours du processus de caroténogénèse (Solovchenko, 2013 ; Grama *et al.*, 2014b). De nombreuses études ont montré l'impact des nutriments sur l'accumulation des lipides et la diminution des protéines suite à la limitation de l'azote (Wang *et al.*, 2019). Ce phénomène similaire a également été observé dans nos expériences.

#### **4. Accumulation de caroténoïdes secondaires**

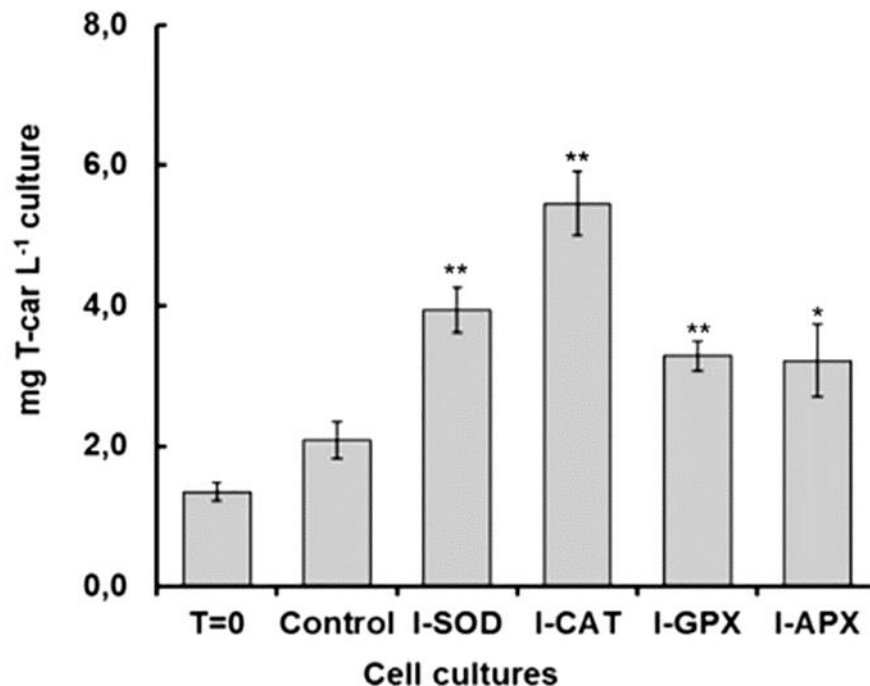
En fonction de leur capacité à gérer les différents types de stress, les algues ont la capacité à produire différents métabolites secondaires afin d'augmenter leurs chances de survie. Il s'agit de métabolites secondaires, souvent produits en réaction à un stress environnemental. Dans certains cas, leur fonction peut être d'augmenter les chances de survie ou de maintenir le taux de croissance dans des conditions spécifiques, mais dans d'autres cas, leur fonction n'est pas connue. De nombreux métabolites secondaires sont susceptibles d'être présents dans toutes les algues suivant les conditions environnementales. Les microalgues sont souvent exposées à des niveaux élevés d'oxygène et à un stress dû à l'irradiation. Par conséquent, ces organismes ont développé des systèmes de défense sous la forme d'antioxydants afin de prévenir les dommages causés aux cellules. Les antioxydants sont produits par les algues en grandes

quantités dans certaines conditions de stress afin de protéger les cellules photosynthétiques du stress oxydatif (Grama *et al.*, 2016).

Les caroténoïdes ont plusieurs fonctions dans les microalgues : ils participent à la récolte de la lumière, mais contribuent également à stabiliser la structure et à faciliter le fonctionnement des complexes photosynthétiques, en plus d'éteindre les états triplets de la chlorophylle, de piéger les espèces réactives de l'oxygène et de dissiper l'excès d'énergie.

Comme le montre la **figure 3.6**, à des niveaux différents selon les différents inhibiteurs enzymatiques ajoutés, la teneur en caroténoïdes des cellules a augmenté pendant la caroténogenèse dans tous les milieux de culture par rapport à la culture témoin. Au début de la caroténogenèse, la concentration initiale de T-Car était de  $1,35 \pm 0,13 \text{ mg L}^{-1}$  et elle a atteint  $5,46 \pm 0,45 \text{ mg L}^{-1}$  au jour 9.

La teneur la plus élevée a été obtenue dans la culture I-CAT, suivie par I-SOD, I-GPX, I-APX et enfin la culture témoin avec des concentrations de  $3,94 \pm 0,32$ ,  $3,29 \pm 0,21$ ,  $3,22 \pm 0,51$  et  $2,08 \pm 0,26 \text{ mg L}^{-1}$  respectivement.



**Figure 3.6** : Comparaison des concentrations de T-car entre l'inoculation (T=0) et la fin (jour 9) du processus de caroténogenèse pour toutes les cultures. La figure représente la concentration en caroténoïdes totaux en  $\text{mg L}^{-1}$  de la culture.

La même tendance à l'accumulation de caroténoïdes a été obtenue lorsque la teneur en caroténoïdes a été comparée à la teneur par unité de masse cellulaire sèche. Toutes les cultures avec inhibiteur enzymatique ont montré une teneur en caroténoïdes plus élevée que la culture témoin (**Fig.3.4**).

La caroténogénèse chez les microalgues est étroitement régulée par des facteurs internes et externes, tels que la lumière, la température, la disponibilité des nutriments et les signaux de stress. Ces facteurs peuvent influencer l'expression des gènes impliqués dans la caroténogénèse et moduler la quantité et le profil des caroténoïdes produits par les microalgues. La caroténogénèse chez les microalgues revêt une importance écologique, nutritionnelle et industrielle. (Takaichi, 2011).

Les caroténoïdes produits par les microalgues sont des nutriments essentiels pour de nombreux organismes, y compris les humains, et présentent des propriétés antioxydantes et des bienfaits pour la santé. De plus, les caroténoïdes d'origine microalgale sont utilisés dans l'industrie alimentaire, cosmétique et pharmaceutique, notamment comme colorants naturels, antioxydants et suppléments nutritionnels (Takaichi, 2011).

La teneur et l'accumulation de caroténoïdes secondaires peuvent varier en fonction de l'enzyme antioxydante inhibée pendant la phase de caroténogénèse, mais aussi en fonction du type et de la concentration de l'inhibiteur pendant la culture. De plus, la réponse de chaque souche d'algues à un inhibiteur donné peut varier, en fonction de sa nature chimique et de l'organisation cellulaire de la cellule.

Par conséquent, l'obtention ou l'optimisation de cultures à forte teneur en caroténoïdes dépassait le cadre de notre étude. Notre objectif principal était d'étudier l'effet de l'inhibition des enzymes antioxydantes sur l'accumulation des caroténoïdes secondaires. Pour la photosynthèse, les caroténoïdes et les chlorophylles sont essentiellement liés à des peptides afin de produire des complexes pigments-protéines dans la membrane thylakoïde (Takaichi, 2011).

Le rapport entre les chlorophylles et les caroténoïdes est un facteur majeur pour préserver l'intégrité du système de photosynthèse. Par conséquent, un équilibre métabolique entre la biosynthèse et le catabolisme des caroténoïdes est important pour préserver les caroténoïdes à des niveaux physiologiques, en particulier dans les tissus photosynthétiques (Beisel *et al.*, 2010).

Les mécanismes d'adaptation aux fortes intensités lumineuses sont essentiels à la survie des algues dans des conditions d'irradiation stressantes. Les mécanismes d'adaptation qui équilibrent l'apport d'énergie et la production d'énergie par l'assimilation du CO<sub>2</sub> et d'autres voies métaboliques sont importants.

Dans nos conditions de culture, la teneur en caroténoïdes la plus élevée a été obtenue dans la culture I-CAT avec une concentration de  $5,48 \pm 0,45$  mg L<sup>-1</sup>. Cette concentration présente une augmentation de 2,6 fois la concentration obtenue dans la culture témoin. Il est à noter que la catalase est unique parmi les enzymes dégradant le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en ce sens qu'elle dégrade le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sans consommer les équivalents réducteurs cellulaires. Ainsi, la catalase fournit à la cellule un mécanisme hautement efficace sur le plan énergétique pour éliminer le peroxyde d'hydrogène.

Par conséquent, lorsque les cellules sont soumises à un stress énergétique et génèrent rapidement du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par des processus cataboliques, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est dégradé par la catalase de manière efficace sur le plan énergétique. Il devrait en résulter un gain net d'équivalents réducteurs et donc d'énergie cellulaire (Mallick et Mohn, 2000).

En général, on peut faire une distinction entre les caroténoïdes primaires et les caroténoïdes secondaires. Les xanthophylles primaires sont définies comme des xanthophylles qui sont des composants structurels et fonctionnels de l'appareil photosynthétique de la cellule et qui sont donc essentielles à la survie cellulaire (Solovchenko et al., 2013).

Les xanthophylles secondaires sont définies comme des xanthophylles que les microalgues ne produisent en grandes quantités qu'après avoir été exposées à des stimuli environnementaux spécifiques (caroténogène).

Tous les caroténoïdes directement impliqués dans la photosynthèse sont appelés caroténoïdes primaires. Les caroténoïdes secondaires, cependant, sont présents dans les cellules en réponse à différents facteurs environnementaux, tels que l'exposition à une forte intensité lumineuse, la carence en nutriments, les changements de température, un pH élevé ou faible, une salinité élevée et le stress oxydatif (Solovchenko et al., 2013).

La teneur en caroténoïdes obtenue a été corrélée avec la teneur en lipides obtenue. Ceci a déjà été rapporté par d'autres études qui ont montré qu'il existe une synchronisation de la surproduction de lipides et de caroténoïdes au cours du processus de caroténogène. Rabbani

*et al.* (1998) ont été les premiers à signaler l'interdépendance entre la formation de corps lipidiques et la formation de caroténoïdes.

Lorsque la synthèse du triacylglycérol était bloquée, la surproduction de  $\beta$ -carotène était également inhibée. Pendant la surproduction de  $\beta$ -carotène, aucune régulation ascendante de la phytoène synthase ou de la phytoène désaturase n'a été observée au niveau transcriptionnel ou traductionnel, alors que dans le même temps, l'acétyl-CoA carboxylase, l'enzyme régulatrice clé de la biosynthèse des lipides acyles, a été augmentée, au moins au niveau de l'activité enzymatique.

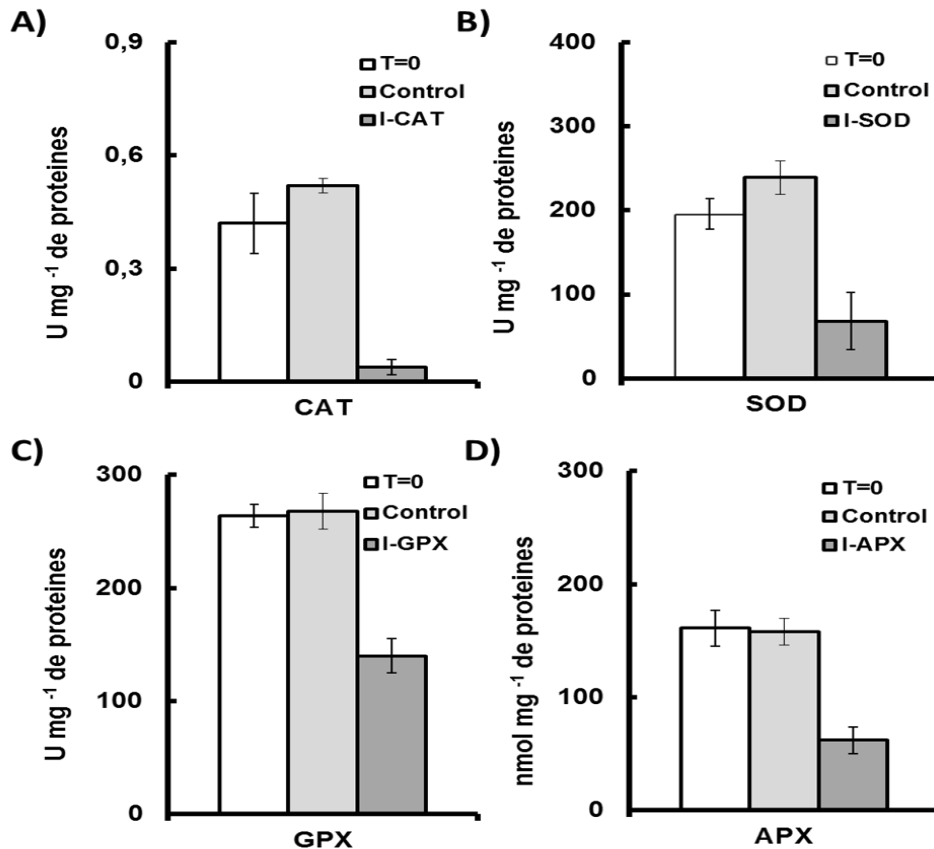
Les auteurs ont conclu que, dans des conditions normales, la voie caroténogène n'était pas entièrement active et qu'elle pouvait être considérablement renforcée par la disponibilité des plastes lipidiques, fournissant ainsi un puits spécifique au site dans les cellules pour le produit caroténoïde final du processus de biosynthèse (Rabbani *et al.*, 1998).

## **5. Effets de l'ajout d'inhibiteurs**

Bien que de nombreux facteurs de stress exogènes puissent induire des réponses chez les microalgues, les résultats de la plupart des études ont porté sur l'utilisation d'une forte lumière et d'une carence de nutriments pour induire un stress oxydatif (Cirulis *et al.*, 2013).

Afin d'explorer les possibilités d'utilisation de la production par les algues de métabolites aux propriétés intéressantes, il est important d'élucider la façon dont les algues réagissent à différentes formes de stress. Dans nos conditions de culture, l'activité des enzymes antioxydants a été modulée par l'ajout de différents inhibiteurs enzymatiques.

Les degrés d'inhibition étaient différents pour les quatre enzymes ciblées. Comme le montre la **figure 3.7.A**, une diminution de l'activité de 91 % a été obtenue pour l'enzyme CAT, suivie de 65 %, 61 % et 47 % pour les enzymes SOD, APX et GPX, respectivement (**figures 3.7.B, 3.7.C et 3.7.D**).

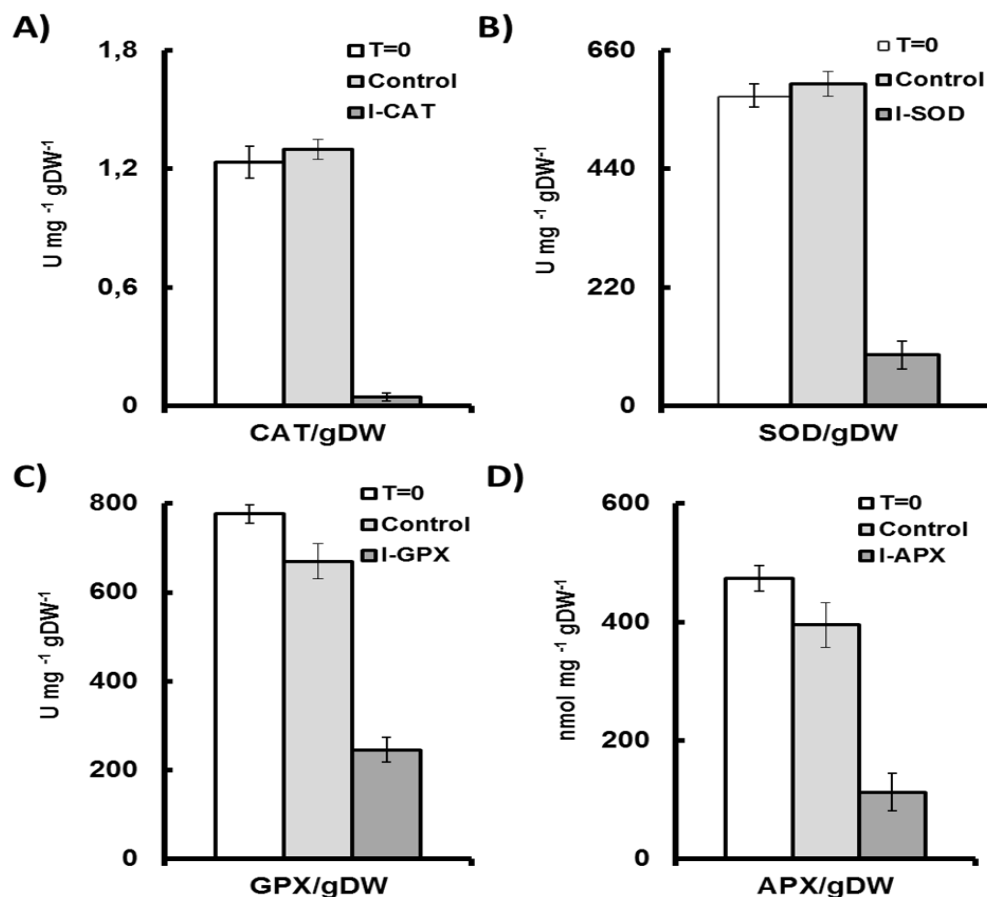


**Figure 3.7** : Activités enzymatiques pour chaque milieu de culture. T=0 représente l'activité enzymatique à l'inoculation. Le contrôle représente l'activité enzymatique de la culture témoin à la fin de la culture. I-enzyme, représente l'activité enzymatique de la culture à la fin de la culture. La **Fig. 3.7.A** représente l'activité CAT, la Fig. 3.7.B l'activité SOD, la Fig. 3.7.C l'activité GPX et la Fig. 3.7.D l'activité APX.

Il est important de noter que le choix de la méthode d'inhibition dépend de l'enzyme spécifique ciblée et de l'objectif de l'étude. Il convient également de prendre en compte les implications potentielles de l'inhibition de l'enzyme sur le système biologique dans lequel elle est présente. Le résultat était le plus remarquable lorsque l'activité enzymatique était comparée à la teneur par unité de masse cellulaire sèche (**Fig.3.8**).

Une diminution de l'activité de 96% a été obtenue pour l'enzyme CAT, suivie de 84%, 76% et 68% pour les enzymes SOD, APX et GPX, respectivement. En revanche, pour la culture témoin qui ne contient aucun inhibiteur enzymatique, une augmentation de 19% de l'activité a été obtenue pour l'enzyme CAT et également une augmentation de 18% pour l'enzyme SOD (**Fig. 3.7.A, 3.7.B**).

Cependant, pour les enzymes GPX et APX, les taux d'activité enzymatique sont restés pratiquement inchangés (Fig. 3.7.C, 3.7.D). Néanmoins, lorsque l'activité enzymatique de la culture témoin a été comparée au contenu par unité de masse cellulaire sèche (Fig. 3.8), on a obtenu une diminution de l'activité de 20 % et de 16 % pour l'APX et la GPX, respectivement.



**Figure 3.8** : Activités enzymatiques pour chaque milieu de culture par unité de masse cellulaire sèche. T=0 représente l'activité enzymatique à l'inoculation par unité de masse cellulaire sèche. La culture de contrôle, représente l'activité enzymatique de la culture témoin à l'arrêt par unité de masse cellulaire sèche. I-enzyme, représente l'activité enzymatique par unité de masse cellulaire sèche de la culture à la fin de la culture. La Fig. 3.8.A représente l'activité CAT, la Fig. 3.8.B l'activité SOD, la Fig. 3.8.C l'activité GPX et la Fig. 3.8.D l'activité APX.

Les cellules végétales ont développé des mécanismes de défense pour combattre le danger posé par la présence de ROS, qui incluent plusieurs mécanismes enzymatiques et non-enzymatiques. Les enzymes antioxydantes comprennent principalement la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPX), l'ascorbate peroxydase (APX).

Les mécanismes non enzymatiques comprennent les caroténoïdes, l'acide ascorbique, les tocophérols, les flavonoïdes et d'autres composés (Mallick et Mohn, 2000 ; Partk *et al.*, 2008). Chaque composé a ses propres conditions de fonctionnement. Par exemple, il y a généralement trois caractéristiques principales affectant les caroténoïdes pour piéger les radicaux libres : la structure des caroténoïdes, le potentiel redox des caroténoïdes et la polarité du milieu (Jomova et Valko, 2013).

Les principales voies d'élimination des ROS des plantes impliquent la SOD, qui est présente dans presque tous les compartiments cellulaires, le cycle eau-eau dans les chloroplastes, le cycle ascorbate-glutathion dans les chloroplastes, le cytosol, les mitochondries, l'apoplaste et les peroxysomes, la glutathion peroxydase et la CAT dans les peroxysomes (Mittler, 2002). L'existence du cycle ascorbate-glutathion dans la plupart des compartiments cellulaires étudiés à ce jour, ainsi que la haute affinité de l'APX pour H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, implique que ce cycle a une fonction critique dans la régulation des niveaux de ROS dans ces compartiments cellulaires (Mittler, 2002).

Ces voies d'élimination des ROS chez les plantes travaillent en concert pour maintenir l'équilibre redox et protéger les cellules végétales contre les dommages oxydatifs. Cependant, des déséquilibres ou des dysfonctionnements dans ces voies peuvent entraîner un stress oxydatif et des dommages cellulaires, ce qui peut avoir des conséquences néfastes sur la croissance et le développement des plantes (Mallick et Mohn, 2000).

Les concentrations intracellulaires de ROS dépendent à la fois des taux de production de ROS et des taux de dégradation des ROS par catalyse enzymatique ou par d'autres mécanismes. Les stratégies précédentes pour induire la production de caroténoïdes étaient axées sur la stimulation de la genèse des ROS, mais notre méthodologie consistait à augmenter les niveaux de ROS en diminuant la décomposition des ROS par catalyse enzymatique dans les différents compartiments cellulaires.

A ce jour, il n'existe aucune étude qui modifie délibérément l'activité de ces enzymes pour augmenter la production de caroténoïdes et aucun travail n'a été rapporté jusqu'à présent liant l'activité des enzymes antioxydantes à la production de caroténoïdes pour l'espèce *Dactylococcus*.

La catalase contient des sites actifs d'hème porphyrine qui dégradent le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en eau (H<sub>2</sub>O) et en oxygène (O<sub>2</sub>) (Cirulis *et al.*, 2013). De même, les réponses de la catalase sous stress salin sont diverses : forte augmentation de l'activité (Shalata

*et al.*, 2002) ou aucun changement (Fadzilla *et al.*, 1997). Sous stress salin, certaines modifications post-traductionnelles de la catalase peuvent également se produire, ce qui peut affecter son activité. Par exemple, la phosphorylation de la catalase peut influencer sa stabilité et son activité enzymatique. L'augmentation de l'activité de la catalase et la modulation de son expression génique sous stress salin sont des mécanismes importants pour atténuer les effets négatifs du stress oxydatif et maintenir l'homéostasie redox dans les cellules végétales. Cependant, il convient de noter que la réponse de la catalase au stress salin peut varier en fonction de la plante spécifique, du degré de stress et des conditions environnementales spécifiques. Contrairement à notre étude, aucun changement dans les activités de la catalase sur toute la gamme des salinités de 0,05 à 3,0 mol L<sup>-1</sup> NaCl n'a été observé pour *Dunaliella tertiolecta* (Jahnke et White, 2003).

Une autre étude suggère que les enzymes antioxydants ne jouent un rôle qu'en cas de stress oxydatif léger (Tripathi *et al.*, 2006). Il convient de noter que l'activité de la catalase peut être influencée par divers facteurs, tels que le pH, la température, les concentrations en substrat et en cofacteurs. De plus, l'expression et l'activité de la catalase peuvent être régulées par des signaux cellulaires spécifiques, tels que le stress oxydatif, les hormones et les facteurs de transcription (Mallick et Mohn, 2000).

La superoxyde dismutase est la première enzyme à fonctionner comme système de défense antioxydant dans les plantes ; elle convertit O<sub>2</sub><sup>-</sup> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à un rythme très rapide (Mittler, 2002 ; Rai *et al.*, 2013). La SOD est la première ligne de défense ainsi que l'unique enzyme capable de catalyser cette réaction. Par conséquent, la SOD occupe une position clé dans le réseau antioxydant (Janknegt *et al.*, 2007).

Les plantes possèdent différentes isoformes de la SOD, telles que la Cu/Zn-SOD, la Mn-SOD et la Fe-SOD, qui peuvent être régulées de manière différentielle en réponse aux stress environnementaux. Chaque isoforme peut jouer un rôle spécifique dans la protection contre les ROS générés par des stress particuliers (Mallick et Mohn, 2000). Cependant, les réponses de la SOD aux stress environnementaux dépendent de l'espèce des algues et des types de stress (Hong *et al.*, 2008).

En outre, l'activité de la SOD dépend de la concentration et du temps lorsqu'elle répond aux ROS initiés par un stress exogène (Cirulis *et al.*, 2013). Dans l'étude de Mallick *et al.* (2002), utilisant les mêmes produits chimiques pour générer des réponses au stress chez *Scenedesmus obliquus*, les auteurs ont rapporté qu'une concentration de 50-500 mmol L<sup>-1</sup> de

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a entraîné une diminution des concentrations cellulaires, des rendements de croissance et de la concentration en chlorophylle (Mallick *et al.*, 2002).

Dans notre étude, nous avons choisi deux métaux lourds, à savoir le zinc pour l'inhibition de la GPX et le cuivre pour l'inhibition de l'APX. Bien que ces composés soient des micronutriments essentiels pour le métabolisme des algues, ils sont délétères à des concentrations élevées (Ameri *et al.*, 2020).

Les métaux lourds pénètrent dans les cellules d'algues par transport actif ou endocytose facilitée par des protéines chélatrices et peuvent perturber l'équilibre oxydatif des algues, notamment en modulant l'activité de GPX et APX, certains métaux lourds, tels que le cuivre (Cu), le zinc (Zn) et le fer (Fe), peuvent être transportés activement à travers les membranes cellulaires des algues. Ce processus implique des protéines de transport spécifiques présentes dans la membrane cellulaire qui reconnaissent et captent les métaux lourds pour les importer à l'intérieur de la cellule (Arunakumara et Xuecheng, 2008 ; Pinto *et al.*, 2003).

Les caractéristiques des espèces d'algues à accumuler les ions de métaux lourds à des degrés divers ont également été souvent rapportées (Jordanova *et al.*, 1999). Il convient de noter que la capacité des algues à absorber et à accumuler les métaux lourds peut varier en fonction de plusieurs facteurs, tels que le type d'algue, la concentration de métaux lourds dans le milieu, le pH, la présence de ligands chélatants et d'autres conditions environnementales. Certains types d'algues sont connus pour être des accumulateurs efficaces de métaux lourds, ce qui en fait des candidats potentiels pour la détoxification de l'eau contaminée par les métaux lourds.

Pour inhiber l'activité de l'enzyme glutathion peroxydase, nous avons utilisé le zinc comme inhibiteur. La glutathion peroxydase (GPX) est une enzyme clé dans la protection cellulaire contre les dommages oxydatifs en réduisant les peroxydes, tels que le peroxyde d'hydrogène, en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme cofacteur. Elle joue un rôle important dans la réponse antioxydante des microalgues et d'autres organismes face aux stress oxydatifs. La réponse et la toxicité de diverses espèces d'algues au Zn<sup>2+</sup> ont été décrites par Whitton (1970) qui a rapporté que la croissance des algues a augmenté suite à de faibles niveaux de métal et totalement inhibée à des concentrations plus élevées. Conformément à notre étude, l'activité GPX de *Pavlova viridis* a montré la même tendance d'évolution lorsque les cellules ont été exposées au zinc.

Lorsque la concentration de Zn<sup>2+</sup> augmente, l'activité GPX diminue progressivement et atteint environ 92,21% du contrôle à 6,5 mg L<sup>-1</sup>. Le même effet a été rapporté par l'étude de

Tripathi *et al.* 2006 avec l'espèce *Scenedesmus* sp. Cependant, dans le cas du zinc, l'inhibition de la croissance pourrait ne pas être liée à la teneur intracellulaire en métal, mais plutôt à sa concentration extracellulaire (Wilde *et al.*, 2006). En fait, le mécanisme suspecté de l'effet toxique du zinc est lié à la membrane cellulaire, où l'absorption du calcium nécessaire à l'activité de la Ca-ATPase dans la division cellulaire peut être affectée par les concentrations de zinc (Stauber et Florence., 1990). Une autre étude a rapporté que l'activité GPX était soit augmentée, soit inhibée, selon l'espèce, le polluant, la concentration et le temps d'exposition (Lozano *et al.*, 2016).

En ciblant l'enzyme Ascorbate peroxydase, nous avons utilisé le cuivre comme inhibiteur à une concentration de 10  $\mu\text{M}$  pour nos expériences. L'activité de l'APX peut être régulée par différents facteurs, tels que les conditions environnementales, le stress oxydatif, les signaux cellulaires spécifiques et les modifications post-traductionnelles. Ces régulations permettent d'adapter la réponse antioxydante des microalgues aux changements de l'environnement et aux besoins métaboliques spécifiques. En utilisant la même concentration, Tripathi *et al.* (2006) ont rapporté que  $\text{Cu}^{2+}$  a causé une inhibition significative de l'activité de l'APX dans des expériences à long terme que dans des expériences à court terme en utilisant *Scenedesmus* sp. Alors que, Lozano *et al.* (2014) ont rapporté que l'activité de l'APX n'a pas beaucoup varié avec 5 et 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  de cuivre en utilisant *Cylindrothec aclosterium*, Ce rapport a indiqué un haut niveau de tolérance au stress oxydatif pour cette microalgue marine (Lozano *et al.*, 2014). Nagalakshmi et Prasad (2001) ont noté que l'activité APX était augmentée dans *Scenedesmus bijugatus* traité avec des concentrations variables de cuivre (0-100 mM).

La comparaison des différentes affinités de l'APX et de la CAT pour  $\text{H}_2\text{O}_2$  suggère qu'elles pourraient être deux types distincts d'enzymes éliminant  $\text{H}_2\text{O}_2$ . L'APX pourrait être impliquée dans la modulation fine des ROS pour la signalisation, tandis que la CAT pourrait être responsable de l'élimination des ROS en excès en cas de stress (Mittler, 2002). Les catalases sont absentes des chloroplastes, et donc la dégradation de  $\text{H}_2\text{O}_2$  dans les chloroplastes est réalisée par l'activité ascorbate peroxydase (Mallick et Mohn, 2000).

Dans la culture témoin, nous avons pu séparer l'effet des différents inhibiteurs d'enzymes utilisés sur le taux d'activité de cette dernière. Une augmentation de 19% de l'activité a été obtenue pour l'enzyme CAT et également une augmentation de 18% pour l'enzyme SOD. En accord avec l'étude de Shi *et al.*, 2018, sous stress environnemental, ces mêmes enzymes antioxydants (SOD, CAT) ont été les premières enzymes à augmenter dès les premiers jours.

Ces deux enzymes sont considérées comme la première ligne de défense contre les dommages causés par les ROS (Ballesteros *et al.*, 2009). De plus, comme la CAT et la SOD ne dépendent pas de la disponibilité d'équivalents réducteurs pour jouer leur rôle, elles peuvent ne pas être affectées par le contenu redox des cellules et leur rôle reste inchangé pendant le processus, contrairement aux autres enzymes antioxydants (Mittler, 2002).

Les réponses antioxydantes particulières dépendent bien sûr du composé toxique en question et du caractère chronique ou aigu du stress. Les conditions chroniques provoquent une augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes, telles que la SOD, la GPX et l'APX. Il semble que la perturbation de l'équilibre oxydatif des chloroplastes induite par les métaux dépende à la fois de la fréquence du stress et des propriétés de chaque métal. Dans ces conditions défavorables, la modulation des antioxydants chloroplastiques semble être une stratégie particulièrement importante, permettant aux algues de s'acclimater au stress environnemental (Mallick et Mohn, 2000).

Dans des conditions aiguës, cependant, les effets toxiques des polluants peuvent dépasser les défenses antioxydantes. Des dommages excessifs aux protéines sous traitement polluant pourraient résulter d'une attaque par des intermédiaires de peroxydation lipidique tels que les radicaux alkyl peroxy et alkoxy ainsi que des produits aldéhydes réactifs. Il peut en résulter la mort cellulaire ou l'arrêt de toute la machinerie cellulaire, comme dans le cas de l'induction de la formation de kystes chez les dinoflagellés (Barsanti et Gualtieri, 2006).

En comparant avec la culture de cellules témoins, nous avons pu constater les effets de l'ajout d'inhibiteurs sur la régulation de différentes enzymes antioxydants pendant la culture sous stress. Les résultats ont montré que l'inhibition d'une de ces quatre enzymes antioxydants entraînait une augmentation de la teneur en caroténoïdes à des niveaux variables, en fonction des enzymes ciblées par l'inhibition.

Ce résultat indique que l'accumulation massive de caroténoïdes pourrait se substituer de manière significative aux enzymes antioxydants pendant la phase de stress (Park *et al.*, 2008). Cependant, il est important de noter que la caroténogénèse secondaire induite par le stress dépend de l'espèce, ainsi que du profil des caroténoïdes secondaires produits, ainsi un mode de stress optimal pourrait exister pour chaque espèce de microalgues.

Dans l'ensemble, il est clair que notre compréhension du métabolisme secondaire et de sa régulation est encore rudimentaire. Les métabolites secondaires comprennent un grand nombre de produits bioactifs naturels, dont beaucoup sont inconnus.

Il est également important de noter que dans des conditions de stress, les microorganismes, et en particulier les microalgues, peuvent induire la production d'isoenzymes pour augmenter leur protection. Ces isoenzymes sont des enzymes qui catalysent la même réaction chimique, mais qui diffèrent au niveau de leur structure et de leur localisation dans l'organisme. Les isoenzymes sont généralement le résultat de l'expression de différents gènes ou de modifications post-traductionnelles des protéines.

Des études sur les différentes isoenzymes de l'enzyme antioxydant ont révélé qu'il existe des différences distinctes dans les réponses aux stress oxydatifs et les fonctions physiologiques pour chaque isoenzyme (Park *et al.*, 2008). Dans l'étude bien décrite de Park *et al.* (2008), les auteurs ont signalé que les altérations des enzymes antioxydants induites par la lumière en exposant les cellules vertes végétatives de l'algue *Haematococcus pluvialis* à des niveaux élevés d'intensité lumineuse.

De plus, le zymogramme PAGE natif a montré de nombreuses variantes d'APX, dénommés APX1, APX2, APX3, APX4 et APX5. L'isozyme APX5, cependant, n'a pas été détectée, tandis qu'une nouvelle bande nommée APXn a été détectée, probablement par la biosynthèse de l'isozyme APXn. Ainsi, l'isozyme APXn pourrait jouer un rôle important dans la tolérance à la lumière intense (Park *et al.*, 2008).

Les microalgues ne sont pas un groupe bien étudié du point de vue biotechnologique. Sur les dizaines de milliers d'espèces de microalgues supposées exister, seuls quelques milliers de souches sont conservées dans des collections à travers le monde, seules quelques centaines ont fait l'objet d'études sur leur contenu chimique et seule une petite minorité a été cultivée en quantités industrielles. La biotechnologie des microalgues a pris une importance considérable au cours des dernières décennies. Les applications vont de la simple production de biomasse pour l'alimentation humaine et animale à des produits de valeur pour des applications écologiques (Grama *et al.*, 2022).

Pour la plupart de ces applications, le marché est encore en développement et l'utilisation biotechnologique des microalgues va s'étendre à de nouveaux domaines. Les microalgues ont le potentiel de produire une large gamme de produits en raison de leur teneur élevée en protéines naturelles, lipides, glucides, vitamines, pigments et enzymes. Bien que divers produits soient fabriqués à partir de microalgues, des études approfondies doivent être menées, notamment sur les processus en amont et en aval, afin de concurrencer les produits existants.

En outre, les microalgues peuvent également être utilisées dans des applications environnementales telles que l'élimination de l'excès de nutriments organiques/inorganiques et de métaux lourds. En outre, les algues retiennent actuellement l'attention parce qu'elles sont capables de réduire de manière significative la concentration des gaz à effet de serre, apportant ainsi une solution au réchauffement de la planète (Bouzidi *et al.*, 2022). Dans l'ensemble, la production de microalgues favorise les perspectives mondiales et peut assurer un développement économique durable à l'avenir. Enfin, il est à noter que, par rapport aux plantes supérieures, le système de défense antioxydant contre l'oxydation et d'autres stress environnementaux chez les algues n'est pas bien étudié au niveau moléculaire (Pinto *et al.*, 2003). Ce point doit être souligné afin d'avoir une compréhension complémentaire entre l'intégration des différentes lignes de défenses cellulaires, notamment les enzymes antioxydants et les caroténoïdes secondaires.

## **Conclusion**

## Conclusion

Les microalgues sont des organismes photosynthétiques eucaryotes, unicellulaires ou pluricellulaires. Ils représentent la base des chaînes alimentaires aquatiques. Aujourd'hui, il existe des centaines de milliers d'espèces différentes, dont certaines sont adaptées pour une croissance dans les environnements extrêmes, comme les eaux minières acides, le désert et même dans la neige.

Les microalgues produisent une variété de composés bénéfiques pour la santé humaine et animale essentiellement les caroténoïdes. Leur diversité biologique et leur potentiel d'exploitation économique sont considérables.

Étant donné que des milliers d'espèces de microalgues n'ont pas encore été découvertes, documentées et utilisées, et aucun travail n'a été orienté vers l'étude de la corrélation entre l'inhibition des enzymes antioxydantes et l'optimisation de la caroténogénèse ; le présent travail s'inscrit dans cette optique et avait comme objectif la modulation de l'activité des enzymes antioxydantes pour l'augmentation de la production des caroténoïdes à partir des microalgues.

Bien qu'il existe des données controversées dans la littérature, l'équilibre ERO/antioxydant cellulaire des microalgues pourrait être affecté par la régulation de l'activité des enzymes antioxydantes, en fonction des conditions expérimentales particulières notamment, l'intensité lumineuse, carence en nitrate et autres conditions.

Différentes espèces de microalgues pourraient présenter des activités enzymatiques antioxydantes différentes en réponse à des conditions environnementales similaires. Cela signifie que les réponses antioxydantes attendues d'une culture cellulaire de microalgues dans un lieu donné et dans des conditions de stress particulières seront une combinaison de facteurs incluant les espèces et même les souches utilisées (Rai *et al.*,2013).

Cependant, notre recherche met clairement en lumière la relation entre l'inhibition des enzymes antioxydantes suivantes : SOD, CAT, GPX et APX en utilisant l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, l'NaCl, le zinc et le cuivre respectivement comme inhibiteurs et la production de caroténoïdes secondaires dans la microalgue *Dactylococcus dissociatus* MT1 isolée du Sahara Algérien.

Les résultats obtenus étaient différents pour les quatre enzymes ciblées dont on a pu observer une diminution de 91 % de l'activité pour la CAT, suivie de 65 %, 61 % et 47 % pour les enzymes SOD, APX et GPX, respectivement.

Les résultats ont montré que l'inhibition d'une de ces quatre enzymes antioxydants entraînait une augmentation de la teneur en caroténoïdes à des niveaux variables, en fonction des enzymes ciblées par l'inhibition.

On peut en conclure que la modulation de l'activité des enzymes antioxydants pourrait avoir un effet positif sur la surproduction de caroténoïdes secondaires. Cette approche nouvelle et prometteuse pourrait permettre le développement de bioprocédés de production de caroténoïdes à partir de microalgues qui ne nécessitent pas l'apport d'une lumière intense dans des cultures cellulaires denses et qui seraient donc plus évolutifs et plus efficaces que les bioprocédés conventionnels.

Le travail effectué ouvre plusieurs perspectives dans le domaine de biotechnologie microbienne dans le secteur industriel :

- I. Il serait intéressant de réaliser une étude sur les isoenzymes impliquées dans ce processus de la caroténogénèse.
- II. Il serait également intéressant d'essayer avec d'autres inhibiteurs afin d'avoir des résultats plus diversifiés et enrichis.
- III. Il serait important de concrétiser cette approche à l'échelle industrielle, des essais avec des contenances plus élevés seront plus représentatifs.
- IV. Il serait également important d'étudier de nouvelles combinaison enzymes / inhibiteurs dont plusieurs inhibiteurs pour une seul enzyme.

## **Références bibliographiques**

## Références bibliographiques

Abadli Mouna, Harkati Gamra (2014), contribution à l'iventaire des quelques microalgues Vertes d'intéret nutritionnel dans quelques zone humides de la wilaya d'El Oued (Lac Ayata, Chott Merrouane, Sife Lemnade, STEP Kouinine, mémoire de fin d'étude, biologie et Valorisation des plantes : p12

Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A.A. and Ibraheem, I.B.M., 2012. Microalgae and wastewater treatment. Saudi journal of biological sciences, 19(3), pp.257-275.

Abou-Shanab, R.A.I.; Hwang, J.-H.; Yunchul, C.; Booki, M.; Jeon, B.-H. Characterization of microalgal species isolated from fresh water bodies as a potential source for biodiesel production. Appl. Energy 2011, 88, 3300–3306.

AMOR, H.B., 2015. Etude et optimisation de bioaccumulation de Mg<sup>2+</sup> dans les Microalgues «Chlorella vulgaris» (Doctoral dissertation, Université Paris-Saclay ; Université De Sfax (Tunisie).

Andersen R. (2005). Algal culturing techniques Elsevier academic press. Pp : 578.  
Anex P. F. 2012. Les Algues comme biocarburant. Mémoire de master 2 Biologie Gestion, Université de Rennes1, France. 32.

Andersen, R. Algal culturing techniques Elsevier academic press, 2005, 578.

Apt et PW Behrens, Développements commerciaux dans la biotechnologie des microalgues : Journal of Phycology [J. Phycol.], vol. 35, non. 2, pages 215-226, avril 1999.

Asfour N Y. (2019)., Production en masse de microalgues : optimisation des paramètres Physicochimiques, ' Thèse de doctorat, Université d'Oran, 2019, 10.

Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2005). Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology. CRC Press.

Becerra-celis, G. P., 2009. Proposition de stratégies de commande pour la Culture de microalgues dans un photobioréacteur continu. Thèse de Doctorat, Ecole Supérieure d'électricité, Gif-sur-Yvette (France).

Becker, E. Sir James Baddiley, N.H.Carey, I. H. W. P. (Ed.) Microalgae: Biotechnology and Microbiology Cambridge Studies in Biotechnology, 1994, 293.

Becker, W., 2004. Microalgae in Human and Animal Nutrition, in: Richmond, A. (Ed.), Handbook of Microalgal Culture. Blackwell Publishing Ltd, pp. 312-351.22153-164.

BELAHMADI Mohamed Seddik Oussama, Etude de la biodégradation du 2,4-dichlorophénol Par le microbiote des effluents d'entrée et de sortie de la station d'épuration des eaux usées d'ibn Ziad ,16/01/2011, p 10.

Benedetti, M., Vecchi, V., Barera, S. And Dall'osto, L., 2018•Biomass from Microalgae: the potential of domestication towards sustainable biofactories. Microbial cell Factories, 17(1), pp.1-18.

Benemann, John R. 1979. "Production of Nitrogen Fertilizer with Nitrogen-Fixing Blue-Green Algae." *Enzyme and Microbial Technology* 1 (2) : 83–90.

Benzidane D. Baba Hamed M.B. and Abi-Ayad S.-M. E.-A. Biodiesel production from marine Microalgae *Nannochloropsis gaditana* by in situ transesterification process. *African Journal of Biotechnology* – 2017.

Berberoglu, H.; Gomez, P. S. & Pilon, L. Radiation characteristics of *Botryococcus braunii*, *Chlorococcum littorale*, and *Chlorella* sp. Used for CO<sub>2</sub> fixation and biofuel production *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 2009, 110, 1879- 1893.

Bilanovic, D., Andargatchew, A., Kroeger, T., Shelef, G. Freshwater and marine Microalgae sequestering of CO<sub>2</sub> at different C and N concentrations – response surface Methodology analysis. *Energy Conversion and Management*, 50, pp. 262–267. 2009.

Bilanovic, D., Andargatchew, A., Kroeger, T., Shelef, G., Feb. 2009. Freshwater and marine Microalgae sequestering of CO<sub>2</sub> at different C and N concentrations – Response surface Methodology analysis. *Energy Conversion and Management* 50 (2), 262–267.

Bitog, J.; Lee, I.-B.; Lee, C.-G.; Kim, K.-S.; Hwang, H.-S.; Hong, S.-W.; Seo, I.-H.; Kwon, K.-S. & Mostafa, E. Application of computational fluid dynamics for modeling and Designing photobioreactors for microalgae production: A review *Computers and Electronics In Agriculture*, 2011, 72, 131-147.

Borowitzka, M.A. 1998. Vitamins and fine chemicals form micro-algae. In: borowitzka, m.a., borowitzka, L.J. (Eds.), *Micro Algal Biotechnology*. Cambridge University Press, pp. 153-196.

Borowitzka, M.A. Commercial production of microalgae: Ponds, tanks, tubes and Fermenters. *Journal of biotechnology*, 70, pp. 313-321. 1999.

Borowitzka, M.A. Microalgae as source of pharmaceuticals and other biologically Active compounds. *Journal of Applied Algal*, 7, pp. 3-15. 1995.

Bouamra, F., Hadj, A.B. (2004). Contribution a l'inventaire qualitatif des Algues dans la Region de Ouargla. Mémoire d'ingénieur d'Etat en biologie. Université d'Ouargla. 88p.

Bouzidi, N. E., Grama, S. B., Khelef, A. E., Yang, D., & Li, J. (2022). Inhibition of antioxidant enzyme activities enhances carotenogenesis in microalga *Dactylococcus dissociatus* MT1. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 1014604.

Brennan, L. & Owende, P. Biofuels from microalgae—A review of technologies for Production, processing, and extractions of biofuels and co-products *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2010, 14, 557-577.

Brennan, Liam, et Philip Owende. «Biofuels from microalgae A review of technologies for production, Processing, and extractions of biofuels and co-products» *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2009.

Bumbak F., Cook S., Zachleder V., Hauser S., Kovar K., 2011. Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: achievements, potential and possible limitations Applied microbiology and biotechnology, 91(1). 31-46.

Cadoret, J. & Bernard, O. La production de biocarburant lipidique avec des microalgues Promesses et défis Journal de la Société de Biologie, 2008, 202, 201-211.

Carlsson, A.S., van Beilen, J.B., Möller, R., Clayton, D. Micro-and macro-algae: Utility for industrial applications, In: Bowles D, editor. Outputs from the EPOBIO Project. UK: CPL Press. Pp. 82. 2007.

Céline Dejoye, 2013. Eco-Extraction et analyse de lipide de micro-algues pour la Production d'algocarburant thèse de doctorat, université d'avignon et des pays de vaucluse ; P 49.177.

Ceron-Garcia. M.C., Fernandez Sevilla J. M., Acien-Fernandez F.G., Molina-Grima E. and Garcia-Amacho F. (2000). Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricommu* on Glycerol: growth rate and fatty acid profile. Journal of Applied Phycology. 12(3/5): 239-248.

Chader S., 2009. Etude du mécanisme de production biologique de l'hydrogène par les Microalgues. Thèse de doctorat : biologie de la rhizosphère. Université des sciences et de La technologie houari Boumediene faculté des sciences biologiques. P80-82.

Chisti Y. (2007). Biodiesel from microalgae Biotechnology Advances. 25 : 294 – 306.

Chisti, Yusuf. «Biodiesel from microalgae» Biotechnology Advances, 2007.

Chojnacka K. And Marquez-Rocha FJ. (2004). Kinetic and stoichiometric relationships of energy and carbon metabolism in the culture on microalgae. Biotechnology. 3(1): 21-34.

Christenson L. and Sims R. (2011). Production and harvesting of microalgae for wastewater Treatment, biofuels, and bioproducts Biotechnology Advances. 29 : 686 – 702.

Costa, J.A.V., Linde, G.A., Atala, D.I.P. Modelling of growth conditions for Cyanobacterium *Spirulina platensis* in microcosms. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 16, pp.15–8. 2000.

de Moraes, M.G., Costa, J.A.V. Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. Vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. Cultivated in flasks and vertical Tubular photobioreactors. Biotechnology Letters, 29, pp. 1349–52. 2007b.

Dejoye, C., 2013. Eco-extraction et analyse de lipides de micro-algues pour la production D'algo-carburant (Doctoral dissertation, Université d'Avignon).

Demirbas, A. & Demirbas, M. F. Algae Energy Algae as a new source of biodiesel Springer, 2010, 199.

Diadié D., 2009. Production d'aliments enrichis en acides gras polyinsaturés à partir de microalgues pour les besoins aquacoles. Mémoire .Québec à Rimouski .139p.

Diao, Y.F., Zheng, X.Y., He, B.S., Chen, C.H., Xu, X.C. Experimental study on Capturing CO<sub>2</sub> greenhouse gas by ammonia scrubbing. Energy Conversion and Management, 45, pp. 2283-96. 2004.

Doe, Camille, Mona Bafadhel, Salman Siddiqui, Dhananjay Desai, Vijay Mistry, Paul Rugman, Margaret McCormick, Joanne Woods, Richard May, and Matthew A Sleeman. 2010. "Expression of the T Helper 17-Associated Cytokines IL-17A and IL-17F in Asthma and COPD." Chest 138 (5): 1140-47

Doré-Deschênes F. (2009). Utilisation des microalgues comme source d'énergie durable Essai de maîtrise en environnement, Université de Sherbrooke, Sherbrooke. Québec. Pp111.

Eriksen, NT. «The technology of microalgal culturing.» Biotechnology letters, 2008.

FAO Lavens, P. & Sorgeloos, P. (Eds.) Manual on the production and use of live food for Aquaculture FAO Fisheries Technical Paper, 1996, 295.

Filali, 2012. Estimation et commande robustes de culture de microalgues pour la Valorisation biologique du CO<sub>2</sub>. Ecole supérieure d'Électricité / Supélec, Paris, 224 p.

Filali, R., 2012. Estimation et commande robustes de culture de microalgues pour la valorisation biologique de CO<sub>2</sub> (Doctoral dissertation, Supélec).

Filali, R., Tebbani, S., Dumur, D., Isambert, A., Pareau, D., Lopes, F., 2010. IFAC-PapersOnLine: Identification of the growth model parameters for a culture of *Chlorella Vulgaris* in a photobioreactor. Computer Applications in Biotechnology.

Garon-L, S. 2004. Etude structurale des polysaccharides pariétaux de l'algue rouge *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniales). Thèse de doctorat en chimie. Université de Bretagne. Pp 226.

Grama, B. S., Chader, S., Khelifi, D., Agathos, S. N., & Jeffryes, C. (2014). Induction of canthaxanthin production in a *Dactylococcus* microalga isolated from the Algerian Sahara. Bioresource technology, 151, 297-305.

Grama, B. S., Delhaye, A., Chader, S., Khelifi, D., Agathos, S. N., & Jeffryes, C. (2014). Canthaxanthin, astaxanthin and adonixanthin production from a *Dactylococcus* microalga in a new flat plate airlift photobioreactor. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, 79, 65.

Grama, B. S., Chader, S., Khelifi, D., Stenuit, B., Jeffryes, C., & Agathos, S. N. (2014). Characterization of fatty acid and carotenoid production in an *Acutodesmus* microalga isolated from the Algerian Sahara. biomass and bioenergy, 69, 265-275.

Grama, B. S., Delhaye, A., Agathos, S. N., & Jeffryes, C. (2016).  $\beta$ -Carotene and Other Carotenoids and Pigments from Microalgae. *Industrial Biotechnology of Vitamins, Biopigments, and Antioxidants*, 265-286.

Grama, B. S., Agathos, S. N., & Jeffryes, C. S. (2016). Balancing photosynthesis and respiration increases microalgal biomass productivity during photoheterotrophy on glycerol. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4(3), 1611-1618.

Grama, S. B., Liu, Z., & Li, J. (2022). Emerging trends in genetic engineering of microalgae for commercial applications. *Marine Drugs*, 20(5), 285.

Grima, E. M.; Sevilla, J. M. F. Pérez, J. A. S. & Camacho, F G. A study on Simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into Account incident and averaged irradiances *Journal of Biotechnology*, 1996, 45, 59-69 .

Grobbelaar, J. U. & Kurano, N. Use of photoacclimation in the design of a novel Photobioreactor to achieve high yields in algal mass cultivation *Journal of Applied Phycology*, Springer Netherlands, 2003, 15, 121-126.

Gupta, N, D K Khan, and S C Santra. 2008. “An Assessment of Heavy Metal Contamination in Vegetables Grown in Wastewater-Irrigated Areas of Titagarh, West Bengal, India.” *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 80 (2): 115–18.14.

Gutierrez, R., Gutierrez-Sanchez, R., Nafidi, A. Trend analysis using Nonhomogeneous stochastic diffusion processes. Emission of CO<sub>2</sub>; Kyoto protocol in Spain. *Stochastic Environmental Research and Risk Assessment*, 22, pp. 57–66. 2008.

Hamedi, C. 2019. Caractérisation génétique, physiologique, biochimique et biodiversité des Diatomées. Thèse de doctorat. *Biotechnologie des organismes aquatiques*. Université d'Oran.-Algerie.

Hanagata N, Chihara M (1999) *Coenocystis inconstans*, a new species of back-Inhabiting green algae (*Chlorophyceae*, *Chlorophyta*). *Journal of Japanese Botany* 71 : 204-211.

Herzog, H. What future for carbon capture and sequestration? *Environmental Science and Technology*, 35, pp. 148A–53A. 2001.

Ho, S-H., Chen, C-Y., Lee, D-J., Chang, J-S. Perspectives on microalgal CO<sub>2</sub>-Emission mitigation systems — A review, *Biotechnology Advances*, Volume 29, Issue 2, pp. 189-198. 2010.

Hu, Q. Environmental effects on cell composition In : Richmond, A. *Handbook of Microalgal Culture – Biotechnology and Applied Phycology* Blackwell Publishing Ltd, 2004, 566.

Idealg., 2014. Etude de la consommation des algues alimentaires en France. A Grocampus Ouest. France.71p.

IEA GHG. Leading options for the capture of CO<sub>2</sub> emissions at power stations, report PH3/14, IEA Greenhouse Gas R&D Programme. Available From: 18. Cheltenham, UK, Feb. 2000.

Israelsson, P.H., Chow, A.C., Adams, E.E. An updated assessment of the acute Impacts of ocean carbon sequestration by direct injection. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 4, pp. 262–71. 2009

Jenck J., Lepine O., Legrand J., Dreno P., Grizeau D. Et Dupre C. (2011). ‘Valorisation Industrielle des Micro Algues Photosynthétiques’, Ed., Technique de l’ingénieur, pp 13.

Khaldi H and Zeggaoui Z. (2014). Contribution à l’étude de la production de biomasse chez Une microalgue verte chlorella sp souche isolée dans le parc national du djurdjura (foret de Darna). Mémoire de master de biologie végétale. Département de biologie animal et végétal. Université mouloud mammeri de tizi-ouzou. 18.

Khettab Zakaria, Toumi Fatna (2019) Contribution à la production de microalgues riche En lipides isolées de la région d’Oued Righ Mémoire de fin d’étude Biochimie Appliqué Université Echahid Hamma Lakhdar -El OUED P59.

Kintisch, E. Climate change: senate looms as bigger hurdle after Copenhagen. *Science*, 327, pp. 19–21. 2010.

Kondili, E.M., Kaldellis, J.K. Biofuel implementation in East Europe: current status and future prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 11, pp. 2137–2151. 2007.

Kuczynska P, Jemiola-Rzeminska M, Strzalka K (2015) Photosynthetic Pigments in Diatoms. *Marine Drugs* 13: 5847- 5881.

Kumar A., Ergas S., Yuan X., Sahu A., Zhang Q., Dewulf J., Malcata F. X. Et Van Lee H.J., Kim Y.A., Park K.E. Jung H.A. Yoo J.S. Woong A.J. Lee B.-J. & Seo Y., 2004 Studies on screening of seaweed extracts for peroxynitrite and DPPH radical scavenging Activities. *Ocean and Polar Research*, 26: 59-64.

Lee y. K. (2001). Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and Potential *Journal of Applied Phycology*, Springer Netherlands. 13 : 307- 315.

Livanský, K. & Doucha, J, CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> gas exchange in outdoor thin-layer high density Microalgal cultures *Journal of Applied Phycology*, Springer Netherlands, 1996, 8, 353-358.

López A V., Ascencio F., Nuño K., (2017), Microalgae, a potential natural functional food source – a review, *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 67, 4, 251–263. Doi:10.1515/pjfn-2017-0017.

Lorne D., 2011. Des Biocarburants à partir des micro-algues. IFP Energies nouvelles.

- Louw, Tobias M, Melinda J Griffiths, Sarah M J Jones, and Susan T L Harrison. 2016. "Techno-Economics of Algal Biodiesel." In *Algae Biotechnology*, 111–41. Springer.
- Lu C., Torzilla G., Vonshak A., 1999. Kinetic response of photosystem II Photochemistry in the cyanobacterium *Spirulina plantensis* to high salinity is characterized by two distinct phases. *Australian Journal of Plant Physiology*. 26, pp. 283-292.
- Lucchetti, A., 2014. Modélisation Et Conception D'un Système De Culture De Microalgues. Thèse doctorat. L'École Nationale Supérieure Des Mines De Paris. France.
- Maeda, K., Owada, M., Kimura, N., Omata, K., Karube, I. CO<sub>2</sub> fixation from flue Gas on coal fired thermal power plant by microalgae. *Energy Conversion and Management*, 36(6-9), pp. 717-720.1995.
- Masojidek, J.; Koblizek, M. & Torzillo, G. Photosynthesis in microalgae In : Richmond, Handbook of Microalgal Culture Biotechnology and Applied Phycology Blackwell Publishing Ltd, 2004, 566.
- Mata, T.M., et al. «Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. » *renewable & sustainable energy reviews*, 2010: 14(1):217-232.
- Matsumoto, H., Hamasaki, A., Sioji, N., Ikuta, Y. Influence of CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> and NO in Flue gas on microalgae productivity. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 30, pp. 620–4. 1997.
- Mayer A. M. S. and Hamann M. T. (2004). Marine pharmacology in 2000: marine Compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, Antiplatelet, anti-tuberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune, and nervous system and other miscellaneous mechanisms of action. *Marine Biotechnology*. 6:37 – 52.
- Meeting, F.B. Biodiversity and application of microalgae. *Journal of industrial Microbiology*, 17, pp. 477-489. 1996.
- Melis, A., Happe, T., 2001. Hydrogen Production. *Green Algae as a Source of Energy*. *Plant Physiol*. 127, 740–748.
- Milledge, J. J. (2010). Commercial application of microalgae other than as biofuels: A brief review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 10 (1), 31-41.
- Mohammed, Kasim. 2013. "Microalgal Photobioreactors for Carbon-Efficient Wastewater Treatment."
- Molina Grima, E. «Microalgae, mass culture methods» *Encyclopedia of bioprocess technology: Fermentation, biocatalysis and bioseparation*, 1999: 3:1753-1769.
- Morrissey, W.A., Justus, J.R. *Global Climate Change*. Cambridge Scientific Abstracts. 1997.

Olaizola, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the Marketplace Biomolecular Engineering, 2003, 20, 459-466

Ördög, V., Szigeti, J., Pulz, O. Proceedings of the conference on progress in plant Sciences from plant breeding to growth regulation. Pannon University, Mosonmagyaróvár. 1996.

Pedruzi G O., Amorim M L., Santos R R., Martins M A., Vaz G., (2020), Biomass Accumulation-influencing factors, Microalgae Farms, 24,134-139. Doi:<http://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi>.

Person J., 2010. Livre turquoise – Algues, filières du futur. Édition Adebitech, Romainville, 163p.

Pierre G. (2010). Caractérisation biochimique d'exo-polymères d'origine algale du bassin de Marennes-Oléron et étude des propriétés physico-chimiques de surface de micro-organismes Impliqués dans leur adhésion. Thèse de doctorat, université la Rochelle. Pp 192.

Plaza, M.G., Pevida, C., Arenillas, A., Rubiera, F., Pis, J.J. CO<sub>2</sub> capture by Adsorption with nitrogen enriched carbons. Fuel, 86, pp. 2204–12. 2007.

Pruvost J., Cornet J. F., Borgne F. Et Jenck J. (2011). Production industrielle de Microalgues et cyanobactéries, Techniques de l'Ingénieur, rubrique Innovations (in200) : PP1 \_17.

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

Pulz, O. Performance Summary Report. Evaluation of GreenFuel's 3D Matrix Algae Growth. Engineering Scale Unit. APS. Red Hawk Power Plant., 2007

Pulz, O., Gross, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. Mini-Review, Applied Microbiology and Biotechnology, Volume 65, Number 6, pp. 635-648. 2004.

Q. Le Bras, L. Ritter, D. Fasquel, M. Lesueur, S. Lucas, S. Gouin, Etude de la Consommation des algues alimentaires en France. Programme IDEALG Phase 1. Etude Nationale., (2014).

Ras M., Steyer J P., Bernard O., (2013), Temperature effect on microalgae: a crucial factor For outdoor production. Reviews in Environmental Science and Biotechnology, Springer, 12, (2)

Rasoul-Amini S., Montazeri-Najafabady N., Mobasher M.A., Hoseini-Alhashemi S. and Ghasemi Y. (2011). Chlorella sp. A new strain with highly saturated fatty acids for biodiesel Production in bubble-column photobioreactor. Applied Energy. 88: 3354 – 3356.

Razaghi A, Godhe A, Albers E (2014) Effects of nitrogen on growth and carbohydrate formation in *Porphyridium cruentum*. Central European Journal of Biology 9:156-162.

Richmond A., 2004. Handbook of microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Eder. Blackwell Science Ltd. 545p.

Sadi M., 2012. Les microalgues : un défi prometteur pour des biocarburants propres. Le 2ème Séminaire International sur les Énergies Nouvelles et Renouvelables.

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

Sierra, E.; Ación, F.; Fernández, J.; García, J.; González, C. & Molina, E. Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae Chemical Engineering Journal, 2008, 138, 136-147

Singh, R. & Sharma, S. Development of suitable photobioreactor for algae production – A Review Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2012, 16, 2347-2353

Solne Moulin, David Rozen-Rechels, Milena Stankovic, Traitement des eaux usées, 2012-2013, p09

Spolaore Pauline, et al. "Commercial applications of microalgae." Journal of Bioscience and bioengineering 101.2 (2006).

Su, W.W., Li, J., Xu, N-S. State and parameter estimation of microalgal Photobioreactor cultures based on local irradiance measurement. Journal of Biotechnology, 105, pp. 165-178. 2003.

T. M. Mata, A. A. Martins, and N. S. Caetano, "Microalgae for biodiesel production and Other applications: A review," Renew. Sustain. Energy Rev., vol. 14, no. 1, pp. 217–232, Jan. 2010.

Taghezout Fatima, (2015). Impact Environnemental Des Rejets D'eau le long Du littoral Occidental Algérien, Université De Oran. (2015).

Taiz L. and Zeiger, E. (2010). Plants physiology. Sinauer Associates, Incorporated.

Tamponet, C., Savage, C., Amblard, P., Laserre, J.C., Personne, J.C., Germain, J.C. Water recovery in space. ESA Bull. 97, 56–60, 1999.

Thomazeau, S. (2006), Diversité phylogénétique et toxique de cyanobactéries du Sénégal Et du Burkina Faso. Mémoire de master. Université de Pierre & Marie CURIE – PARIS- 6. 44 p.

Tredici M. R. (2004). Mass production of microalgae: Photobioreactors. In: Richmond, A. Handbook of Microalgal Culture Biotechnology and Applied Phycology Blackwell Publishing Ltd. Pp : 566.

Venkatesan, J., Manivasagan, P. et Kim, S.K., 2015. Marine microalgae Biotechnology: present trends and future advances. In Handbook of Marine microalgae (pp. 1-9). Academic Press

Vieira, M. V, Pastrana, L. M., & Fuciños, P. (2020). Microalgae encapsulation systems fo Food, pharmaceutical and cosmetics applications. Marine drugs, 18(12), 644.

Wang, B., Li, Y., Wu, N., Lan, C.Q. CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. Applied Microbiology and Biotechnology, 79, pp. 707–718. 2008.

Wheeler, R.M., Mackowiak, C.L., Sager, J.C., Corey, K.A., Dreschel, T.W., Vieux, B.A., Knott, W.M., Prince, R.P., Hinkle, C.R. Crop tests in NASA's Biomass production chamber – a review of the last four years of operation, in: Proceedings of the International Life Support and Biospherics Conference, Huntsville, KL, pp. 563-573, 1992.

Yun, Y.-S. & Park, J. M. Kinetic modeling of the light-dependent photosynthetic activity Of the green microalga *Chlorella vulgaris* Biotechnology and Bioengineering, 2003, 83, 303-311

Zame, K.K. Carbon capture using the microalgae *Chlorella vulgaris* in a packed Bubble column photobioreactor. PhD, Youngstown State University, USA, 2010.