

S O M M A I R E

INTRODUCTION	1
I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	4
1/Les microalgues	6
2/Nannochloropsis sp	30
3/La cellulose	32
4/les hémicelluloses	34
5/La lignine	37
6/ L'holocellulose	38
7/Microalgues et métaux lourds	38
II. MATERIELS ET METHODES	49
1/Matériel biologique	50
2/Culture de Nannochloropsis gaditana	50
3/ Extraction des métabolites pariétaux	52
4/ Caractérisation physicochimique des polymères pariétaux	54
5/ Production de nanoparticules de cellulose	56
6/ Dosage des métaux lourds par SAA	56
III RESULTATS ET DISCUSSION	60
1/ Caractérisation de la cellulose de <i>Nannochloropsis gaditana</i>	62
2/ Caractérisation de l'hémicellulose de <i>Nannochloropsis gaditana</i> par FT-IR	69
3/ Caractérisation de l'holocellulose par FT-IR	72
4/ Analyse des composés pariétaux de <i>Nannochloropsis gaditana</i> par RMN solide	74

5/ Analyse thermogravimétrique des composés pariétaux de <i>nannochloropsis gadihana</i>	78
6/ Analyse par calorimétrie différentielle à balayage	80
7/ Etude des nanoparticules cellulose.....	80
8/ Effet des métaux lourds sur la croissance de <i>Nannochloropsis gadihana</i> ...	81
IV CONCLUSION.....	91
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	94

INTRODUCTION

Les microalgues sont de organismes unicellulaires, photosynthétiques, autotrophes, apparues il y'a plus de trois milliards d'années et peuplant des milieux extrêmement variés. Ces microorganismes suscitent un intérêt grandissant en raison de leurs propriétés biologiques et métaboliques qui se révèlent très prometteuses pour de nombreuses applications dans différents domaines tels que l'industrie pharmaceutique, cosmétique, l'agroalimentaire, l'environnement et la production de biocarburants. Les microalgues de par leur richesse en protéines et acides gras polyinsaturés constituent un réel apport nutritif, utilisé dans l'alimentation humaine et animale. C'est aussi une source de molécules bioactives (activités antioxydantes, antivirales et anticoagulantes..) très prisées dans le domaine pharmaceutique et médical. Elles sont notamment connues pour leur grande productivité en vitamines tels que la vitamine A, B1, B6 et la vitamine E de grand intérêt commercial, ainsi que de pigments utilisés en agroalimentaire ou dans l'industrie cosmétique et pharmaceutique.

Ces microorganismes sont aussi utilisés dans le domaine de la bioremédiation pour dépolluer divers environnements.

Les microalgues de par leur pouvoir photosynthétique et leur structure cellulaire sont considérées comme du matériel végétal, cependant leur exploitation présente plusieurs avantages par rapport à l'utilisation des plantes terrestres : leur croissance est plus rapide et la séquestration en CO₂ est plus élevée. Un gramme de microalgue peut absorber 1.8g de CO₂. Elles sont capables de croître dans des milieux aqueux salins, eaux usées et eaux saumâtres et peuvent même être cultivées dans des terres en friche. Nombre de travaux sont réalisés sur les microalgues cette dernière décennie, mais vue leur grande

diversité, plus de 1000 000 connues, seulement une dizaine est exploitée industriellement essentiellement dans le domaine bioenergetique.

Nannochloropsis gaditana une microalgue de la classe des eustigmatophyceae riche en lipides fait l'objet de nombreux travaux en vue de sa production en masse pour produire du Biodiesel. A Madegh dans le nord ouest de l'Espagne sa production couvre environ 30% des besoins énergétiques de la localité.

En Algérie cette microalgue est produite en masse par le groupe Partisano Biotech Algerie en vue dans un premier temps de produire des protéines comme additif pour alimentation de bétail. Mais ce groupe a vite fait d'élargir l'éventail d'utilisation de cette biomasse et pris contact avec des laboratoires de recherche nationaux et internationaux, dont notre laboratoire AQUABIOR (aquaculture et bioremédiation), dans un but de valorisation des métabolites de *Nannochloropsis gaditana*.

Le genre *Nannochloropsis* fait parti des eustigmatophytes marins, photosynthétiques, présentant un intérêt significatif dans le secteur bioénergetique et de l'aquaculture en raison de leur capacité à accumuler efficacement les lipides pour la production de biocarburants, des aliments pour l'aquaculture et d'autres bioproduits utiles.

Lors de ce travail de thèse, nous nous intéressons à deux aspects :

- Un aspect chimique qui consiste à extraire et caractériser les polysaccharides (cellulose, hémicellulose, holocellulose) de la paroi cellulaire de *Nannochloropsis gaditana*. La cellulose qui représente le principal composé pariétal de cette espèce est caractérisée en vue de sa valorisation. Ce polymère est un produit de grande valeur ajoutée.
- Un deuxième aspect de bioremédiation, qui consiste à étudier le comportement de *N.gaditana* à différentes concentrations de métaux lourds (Fe, Cu et Cd).

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1/Les microalgues :	6
1/a- Classification des micralgues :	7
-Les bacillariophycées (diatomées).....	8
-Les dinophycées (dinoflagellées).....	8
-Les Rhodophycées (microalgues rouges).....	9
-Les Chlorophycées (microalgues vertes).....	9
-Les Eustigmatophyceae.....	10
-Les Algues bleues.	11
1/b -Le cycle cellulaire des microalgues.....	13
1/c --Cinétique de croissance des cultures phytoplanctoniques.....	14
1/d -Distribution et habitat	15
1/e- La paroi des microalgues	16
1/f- La culture des microalgues :.....	17
1/g Utilisation des microalgues	21
-Utilisation des microalgues en alimentation humaine et animale... ..	21
-Utilisation des microalgues dans l'industrie pharmaceutique	22
-Utilisation des microalgues dans l'industrie cosmétique.....	22
- Utilisation des microalgues dans la santé humaine.....	23
-En agriculture.....	23
-Dans l' environnement	24
• Traitement des effluents liquides.....	24
• Traitement des polluants métalliques.....	24
• Traitement des effluents gazeux.....	25
1/h -Production d'énergie	26
1/i Utilisation des microalgues dans l'industrie chimique.....	30
2/Nannochloropsis sp	30
2/a- Structure de Nannochloropsis sp	31
2/b- Intérêt de Nannochloropsis sp.	31
3/La cellulose	32
3/a-Généralités.....	32
3/b -Structure chimique de la cellulose.....	33
3/c- Intérêt de la cellulose.....	34
4/les hémicelluloses.....	34
4/a- La structure chimique des hémicelluloses.....	34
4/b -L'intérêt des hémicelluloses.....	35
5/La lignine.....	37

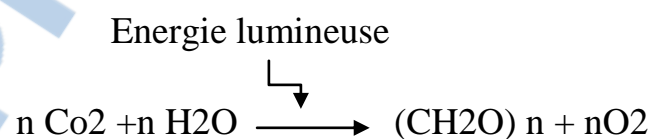
6/ L'holocellulose.....	38
7/Microalgues et métaux lourds.....	38
7/a-Eléments traces métalliques (ETMs).....	40
7/b-ETMs et phytoplancton.....	41
-Absorption des ETMs par le phytoplancton.....	41
- Effet des ETMs à fortes concentrations sur le phytoplancton	42
- Mécanismes de défense mis en place par le phytoplancton contre la contamination métallique.....	43
- Les indicateurs cellulaire et biochimiques des effets toxiques du Cd.....	46
-Les mécanismes de réponse au stress envers le Cd	46
- Mécanismes de distribution cellulaires des métaux	46

1/Les microalgues :

Les algues désignent un ensemble d'organismes que l'on retrouve préférentiellement dans les milieux aquatiques. Elles rassemblent à la fois les macroalgues benthiques (fixées sur un support) ainsi que des organismes microscopiques pélagiques (en eau libre, du fond à la surface) : les microalgues. Ces dernières, dénommées également phytoplancton, sont définies comme étant des organismes unicellulaires ou pluricellulaires indifférenciés. Sous cette désignation, elles constituent un sous-ordre des Eucaryotes ou des Procaryotes. Dans ce dernier règne, les représentants des microalgues sont regroupés dans la sous-classe des Cyanobactéries.

Les microalgues sont des organismes microscopiques, unicellulaires. Leur taille varie de quelques micromètres à une centaine de micromètres. Elles vivent sous forme libre ou en colonie et appartiennent à deux groupes : les eucaryotes et les procaryotes (cyanobacteries) (Knukey,1998).

Ce sont des organismes photoautotrophes . Ils utilisent les rayons solaires afin de synthétiser leur énergie (stevensen et al, 1996). Cette réaction assure la transformation du dioxyde de carbone en énergie chimique en captant l'énergie lumineuse. Ce mécanisme consiste en une réaction d'oxydoréduction catalysée par l'énergie lumineuse et qui convertie le dioxyde de carbone et l'eau en sucres simples et en oxygène (Sialve et al, 2013) selon la réaction suivante :



Ces microorganismes jouent un rôle majeur dans les écosystèmes marins en tant que producteurs primaires. Ils forment le phytoplancton qui est à la base de nombreuses chaînes alimentaires. (Godet S, 2008).

Les microalgues sont aujourd'hui décrites comme des usines cellulaires qui utilisent comme matières premières l'énergie solaire et le carbone minéral pour

produire des biocarburants potentiels, des aliments et des molécules bioactives à haute valeur ajoutée (Chisti, 2007).

1/a- Classification des micralgues

Les microalgues constituent un groupe extrêmement hétérogène rassemblé autour d'une cohérence physiologique : la photosynthèse oxygénique (Andersen, 1992). Cette famille rassemblerait de plusieurs centaines de milliers à plusieurs millions d'espèces selon les estimations, parmi lesquelles 47000 espèces sont décrites (Andersen *et al*, 1997 ; Sharma and Rai, 2011). Par comparaison, la diversité des plantes supérieures est de l'ordre de 400 000 espèces. La classification de cette diversité est complexe et la taxonomie est sujette à de fréquents bouleversements du fait notamment de l'utilisation des techniques de phylogénie moléculaire.

Les microalgues constituent un groupe extrêmement hétérogène et cette diversité est basée sur des propriétés telles que la pigmentation, la nature chimique des produits de stockage issus de la photosynthèse, l'organisation des membranes photosynthétiques et d'autres caractéristiques morphologiques et génétiques (Anderson ,1992 ; Person et al, 2011 ; Silave et Steyer 2013,).

Il existe donc différentes classes taxonomiques dont les principales sont: les bacillariophycées (diatomées), les dinophycées (dinoflagellées), les prymnésiohycées, les xanthophycées (microalgues vert-jaune), les rhodophycées (micro algues rouges), les chlorophycées (microalgues vertes), les chrysophycées (micro algues d'or), les phéophycées (microalgues brunes) et les Eustigmatophyceées (pico-plancton). (Knukey,1998)

- Les bacillariophycées (diatomées) :

Les diatomées sont considérées comme majoritaires, car elles représentent souvent le groupe dominant parmi les populations de phytoplancton et sont

extrêmement répandues dans tous les types d'habitat. Elles se distinguent des autres groupes par leur carapace de silicium et leur diploïdie. Comme toutes les microalgues, les diatomées sont unicellulaires. Elles mesurent de 2 μm à 1 mm. Elles emmagasinent leurs réserves sous forme de chrysolaminarine, un polysaccharide, ainsi que sous forme d'huiles. Elles sont reconnues par leur contenu en acides gras. Elles sont responsables de 20 % de la production carbonée océanique (Kroth et al., 2008). Parmi les espèces de diatomées, on retrouve : *Cylindrotheca closterium* (Fig.01) et *Navicula directa* (Fig.02)



Figure.01: *Cylindrotheca closterium*



Figure .02: *Navicula directa*

- Les dinophycées (dinoflagellées) :

Les dinoflagellés sont des microalgues unicellulaires de couleur rouge orangé et de taille moyenne ou petite, entre 3 et 50 microns. Leurs deux flagelles leur permettent d'effectuer des déplacements tournoyants et des migrations verticales. Dans le cas des dinoflagellés de métabolisme hétérotrophe, les flagelles deviennent alors un moyen leur permettant de capturer les matières organiques qui se trouvent dans leur environnement. Cette classe regroupe beaucoup de microalgues toxiques. Ainsi, trois espèces principales de dinoflagellés sont redoutées: *Dinophysis* (50 microns) (Fig.03) et (Fig.04) qui contiennent des toxines (DSP: Diarrhetic Shellfish Poison) responsables des troubles gastro-intestinaux chez l'homme, *Alexandrium* (de 20 à 25 microns) qui produit des toxines paralysantes (entre 20 et 25 microns).(Kroth et al,2008)

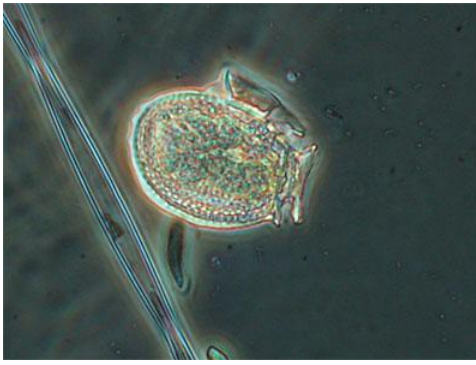


Figure .03 *Dinophysis acuminata*

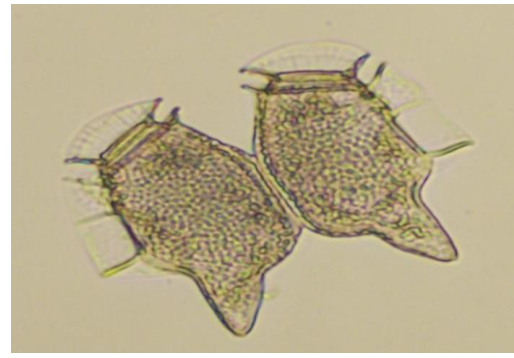


Figure.04 *Dinophysis caudate*

-Les rhodophycées (microalgues rouges) :

- Les rhodophycées se distinguent par leurs plastes appelés «rhodoplastes» colorés en rouge par les phycobiliprotéines et par la présence des synapses entre les cellules et d'amidon floridéen. Ces algues sont retrouvées plutôt dans les eaux salées (ex., *Porphyridium*) (Fig.05) et très rarement dans les eaux douces.

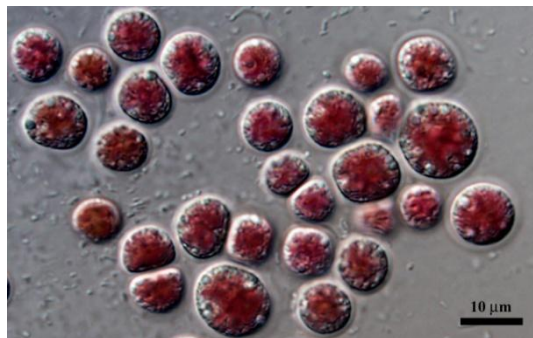


Figure .05 : *porphyridium cruentum*

-Les chlorophycées (microalgues vertes)

Les chlorophycées sont retrouvées dans tous les types d'habitat. L'amidon et l'huile constituent leurs principales réserves énergétiques. Une des espèces les plus répandues est *Chlorella vulgaris*. Cette espèce est très intéressante pour la production de biodiesel en raison de son contenu intéressant en acides gras. On trouve également *Chlamydomonas reinhardtii* (Fi.07) qui est une espèce modèle dans de nombreuses études de laboratoire. (Knukey,1998)

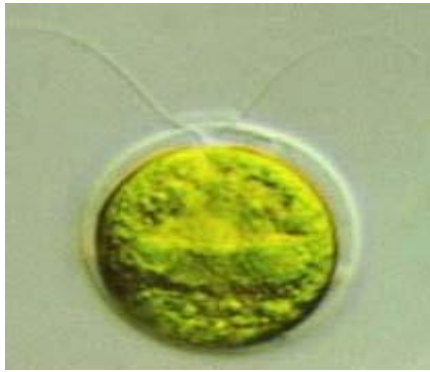


Figure .06: *Chlamydomonas*

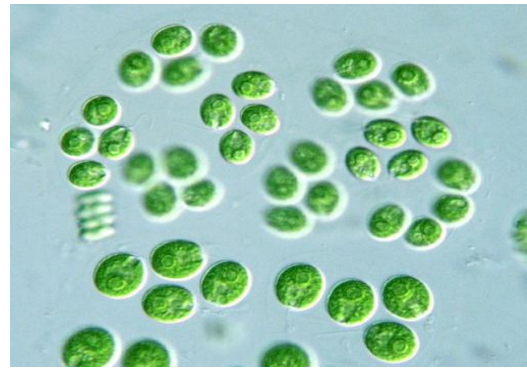


Figure.07: *Chlamydomonas reinhardtii*

Les Eustigmatophyceae

Ce groupe constitue une petite division de microalgues, considérée comme une lignée distincte (Patterson et al., 1994 ; Adl et al., 2005). Ces microalgues se distinguent par leur coloration vert-jaunâtre due à leur composition spécifique en pigments. En effet, elles contiennent des chlorophylles de type a, sans chlorophylle b et c, et des principaux pigments accessoires comme les violaxanthine et vaucheriaxanthine. Cette classe comporte environ 20 espèces regroupées dans 11 genres , exemple : *Pseudocharaciopsis ovalis* (Fig.08) et *Eustigmatos polyphem* (Fig.09).

Tous les membres sont des microalgues unicellulaires avec un ou plusieurs plastes pariétaux de couleur vert-jaunâtre, vivant individuellement ou en colonies. Leur environnement d'origine est le sol et l'eau douce (Knukey,1998)

Le genre *Nannochloropsis* renferme des espèces marines caractérisées par leurs petites tailles (2-4 μm). La plupart des cellules des eustigmatophytes ont une forme coccoïde. C'est le cas de *Nannochloropsis*. Par contre, il existe également d'autres morphologies cellulaires (ovale, ellipsoïdale ou irrégulière). (Knukey,1998)

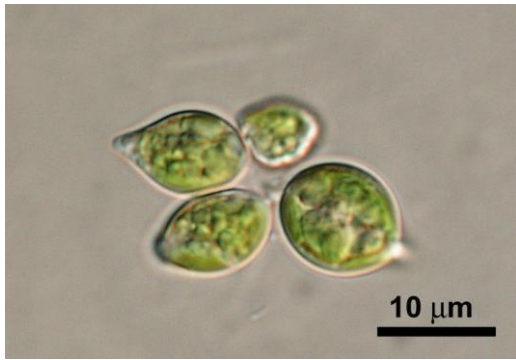


Figure.08 : *Pseudocharaciopsis ovalis*



Figure.09 : *Eustigmatos polyphem*

- Les algues bleues :

Ce sont les algues les plus simples. Elles sont souvent groupées en colonies entourées d'une masse gélatineuse, pourvues d'un noyau diffus, elles possèdent de la chlorophylle, un pigment vert-bleu mêlé au cytoplasme. On les rencontre généralement dans les eaux douces ou marines, ou sur la terre humide comme le genre : *Nostoc* (Fig.10). Certains sont capables de vivre dans les eaux thermales à une température de 60 à 70°C.



Figure .10 : *Nostoc* sp.

Si l'on considère uniquement la pigmentation, nous observons différentes classes taxonomiques dont les principales sont représentées dans le tableau 1 (Cavalla M,2000)

Tableau 1 : Classification des algues selon la pigmentation

Embranchement (Regne)	Nombre d'espece	Représentants	Pigments	Paroi	Habitat
Chlorophytes (Algues vertes)	7500	Chlorella Spirogyna	Chloro a, b Xanthophylles Carotènes	Cellulose Mannanes protéines	Eau douce Saumâtre Salée et terrestre
Phaeophytes (Algues brunes)	1500	Laminaria Fucus	Chloro a , b Xanthophylles Carotènes	Cellulose Alginate Fucoidane	Eau salée et saumâtre
Rhodophytes (Algues rouges)	3900	Gracilaria Gelidium	Chloro a Rarement b Xanthophylles Carotènes, zeaxanthine, phycocyanine C, phycoérythrine	Cellulose Xylanes Galactanes	Eau douce saumâtre salée
Cyanophytes (Procaryotes) (Cyanobactéries ou algues bleues)		Anabaena Nostoc	Chloro a Allophycocyanines, phycocyanine, phycoérythrocyanine		Eau fraiche, Salée, Saumâtre, sols

1/b -Le cycle cellulaire des microalgues

Les cellules eucaryotes qui se divisent passent par une séquence d'étapes: c'est le cycle cellulaire (Fig.11)

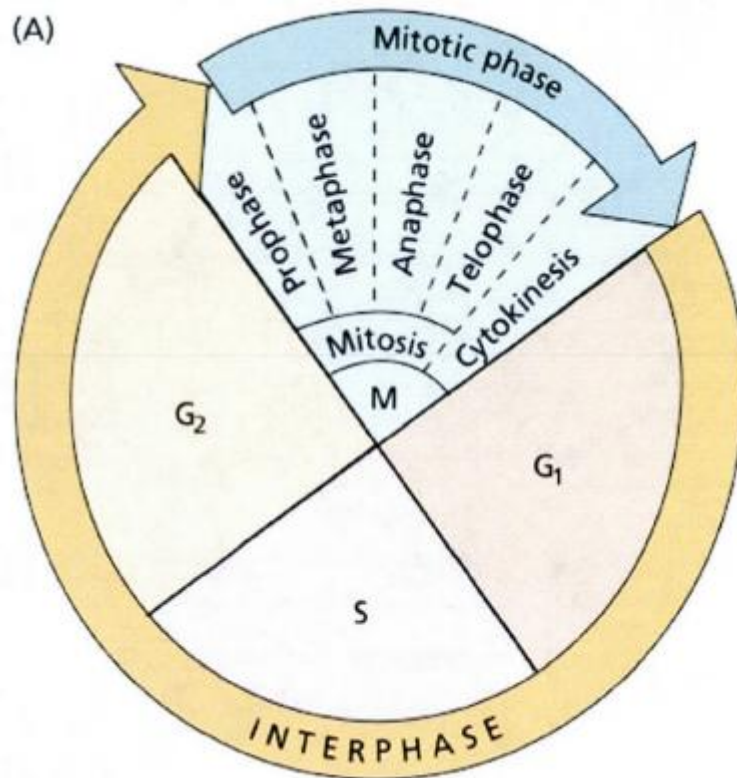


Figure .11 : cycle cellulaire des microalgues

-Définition des phases :

G1 : le volume de la cellule augmente en faisant augmenter le nombre d'organites, d'enzymes et autres molécules.

S : répllication de l'ADN et synthèse des protéines associées~ il existe maintenant deux exemplaires de l'information génétique cellulaire.

G2: début de l'assemblément des structures nécessaires à la division cellulaire, les chromosomes commencent à se condenser.

M (Mitotic phase) : les deux lots de chromosomes se séparent (mitose) et la cellule se divise (cytokinèse).

Le cycle cellulaire est habituellement divisé en une interphase précédant la mitose, l'interphase étant elle-même divisée en trois stades, représentés par G₁, S et G₂, L'achèvement du cycle est d'une durée variable, soit de quelques heures à plusieurs jours, dépendamment du type de cellule et des facteurs externes tels que les éléments nutritifs disponibles et la température (Raven et al., 2000).

1/c --Cinétique de croissance des cultures phytoplanctoniques

La croissance des cellules phytoplanctoniques mises en culture présente quatre phases essentielles (Fig.12) :

► Une phase de latence (1), pendant laquelle la croissance des cellules est lente. La durée de cette phase dépend des volumes respectifs d'inoculum et de milieu de culture, et surtout de l'acclimatation de la culture mère aux nouvelles conditions dans le récipient de culture (Ifremer, 2007).

► Une phase exponentielle (2), justement définie par le caractère exponentiel de la croissance. L'augmentation du nombre de cellules (dN) par unité de temps (dt) est alors proportionnelle au nombre de cellules présentes à l'instant t (Fig.12). Le facteur de proportion est appelé taux de croissance instantané (μ) et s'exprime selon la formule (1) (Landry et Hassett, 1982) :

$$\mu = \text{Ln} (N_t/N_0) / \Delta t \quad (1)$$

Avec : Ln = logarithme népérien

N_0 = biomasse au temps t_0

N_t = biomasse au temps $t > t_0$

Δt = intervalle de temps $t - t_0$

Le taux de croissance est souvent exprimé en nombre de dédoublements par unité de temps.

► Une phase stationnaire (3) qui perdure jusqu'à ce qu'un élément, dit « limitant » (le plus souvent un élément nutritif comme l'azote ou le phosphore), dont la concentration est plus faible par rapport aux besoins du phytoplancton, atteigne une valeur qui ne peut plus satisfaire la demande des cellules (Figure 6). A ce stade, le taux de croissance μ décroît jusqu'à zéro, et la culture entre en phase stationnaire : la biomasse et/ou le nombre de cellules n'augmente(nt) plus. D'autres causes, comme la diminution de la lumière disponible due à l'auto-ombrage des cellules devenues très abondantes, peuvent aussi être à l'origine d'un fléchissement du taux de croissance, sans toutefois l'annuler (Ifremer, 2007).

► Une phase de déclin (4), aussi appelée phase de sénescence, se traduisant par la mort des cellules, lesquelles ne trouvent plus dans le milieu de culture les éléments nécessaires à leur survie. Elles libèrent alors leurs constituants cellulaires.

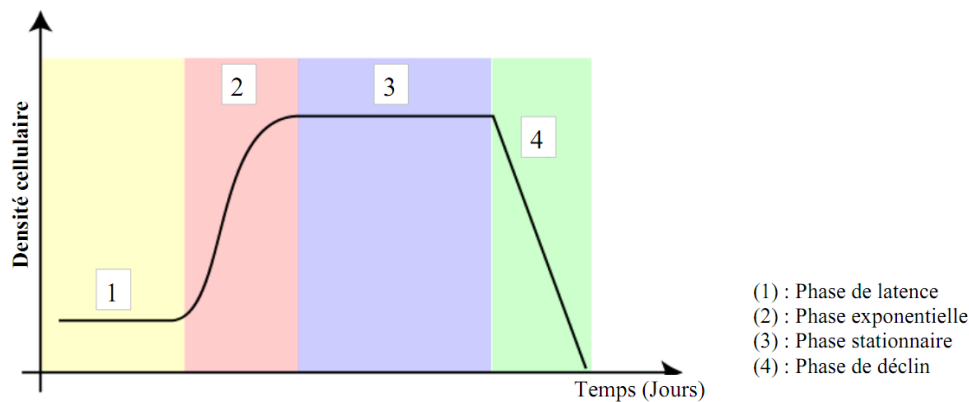


Figure.12: Cinétique de croissance des cellules phytoplanctoniques mise en culture

1/d -Distribution et habitat :

Les microalgues occupent la plupart des niches écologiques. Si elles sont surtout présentes dans les environnements aquatiques, elles ont su également coloniser les sols et une vaste gamme de supports comme les rochers, les arbres ou encore les édifices architecturaux (Macedo et al., 2009). Preuve de leur diversité d'habitats, certaines microalgues se développent dans les eaux de fonte de la glace ou de la neige et on les rencontre également dans les déserts arides à semi-arides. L'atmosphère constitue également un environnement dans lequel une diversité notable de microalgues eucaryotes et de cyanobactéries est signalée (Sharma *et al.*, 2007). Enfin, cette capacité à coloniser l'ensemble de la biosphère est une propriété qui, comme pour les bactéries non photosynthétique, leur permet de se développer dans des conditions dites « extrêmes ». C'est grâce à l'absence de structure complexe autre que la cellule et à un métabolisme orienté principalement vers la production d'énergie que les microalgues ont cette capacité à être notablement ubiquistes (Falkowski et Raven, 1997).

85 % des biotopes de la terre présentent des conditions de températures inférieures à 5°C (Margensin et Miteva, 2011). Ces milieux hébergent une diversité remarquable de microorganismes photosynthétiques psychrophiles.

Parmi ceux-ci , il y'a *Chlamydomonas nivalis*, responsable des colorations rouges sur les neiges qui présente en outre une résistance aux radiations UV du fait d'une accumulation d'asthaxanthine dans son cytoplasme. A l'inverse, dans des conditions thermophiles, la cyanobactérie *Synechococcus* est capable de croître dans les sources d'eau chaude (60-80°C), par ailleurs alcalines et dans des sources chaudes (38-57°C) et acides (pH 0,5-2,5). Les microalgues rouges *Cyanidioschyzon*, *Cyanidium* et *Galdieria* sont les seules représentantes des Eucaryotes identifiées à ce jour capables de se développer dans ces milieux. Parmi les espèces acidophiles, *Dunaliella acidophila* croît dans une gamme de pH de 0 à 3 (Assunção *et al.*, 2011).

1/e- La paroi des microalgues

La plupart des microalgues présentent une paroi similaire aux structures pariétales des plantes supérieures offrant des structures polysaccharidiques et protéiques plus ou moins complexes. La présence de ces parois est déterminante dans la fonction de résistance aux lyses enzymatiques d'origine bactérienne ou lors du passage dans le tractus digestif des prédateurs. Elles les préservent également des conditions environnementales potentiellement délétères. Enfin, la présence et la composition de ces structures externes constituées d'algaénans chez certaines espèces de microalgues , constituent une barrière qui détermine l'accessibilité au contenu intracellulaire pour des attaques biologiques, physiques et chimiques pour les filières de valorisation de ces biomasses (González-Fernández *et al.*, 2011).

1/f- La culture des microalgues

Les besoins nutritifs des microalgues sont similaires à ceux des plantes supérieures (Becker 1994).

Redfield (1934) a proposé une composition élémentaire C:N:P de 106:16:1. Cette composition est relativement constante dans le milieu naturel. Défini par Vonshak (1986) le milieu de culture devra satisfaire les besoins en éléments

majeurs (ou macroéléments) C, H, N, O, P, S et en micro-éléments encore appelés éléments traces. Le tableau suivant (Tableau 1) indique des ordres de grandeurs pour les éléments majeurs constitutifs des microalgues.

Tableau 2 : Eléments majeurs constitutifs des microalgues.

Elément	Composition cellulaire µg/mg de poids sec	Elément	Composition cellulaire µg/mg de poids sec
C	176-650	Mg	0,5-75
O	205-330	Fe	0,2-34
H	29-100	Zn	0,005-1
N	10-140	Mn	0,02-0,24
Na	0,4-47	Si	0-230
K	1-75	B	0,001-0,25
P	0-80	Mo	0,0002-0,001
S	1,6-16	Cu	0,006-0,3
		Co	0,0001-0,2

L'approvisionnement en nutriments :

Le carbone :

Le carbone est le constituant majeur des microalgues (Van den Hende *et al.*, 2012). Si, vis-à-vis de cet élément, la plupart des microalgues mobilisent un métabolisme exclusivement photoautotrophe (utilisation de lumière comme source d'énergie et du carbone inorganique), d'autres présentent un métabolisme hétérotrophe (utilisation du carbone organique en absence de lumière) voire mixotrophe (métabolismes photoautotrophe et hétérotrophe conjugués), simultanément ou séquentiellement (Bumbak *et al.* 2011; Becker. 1994). Dans le cas du métabolisme photoautotrophe, le carbone inorganique pourra être introduit dans la culture sous forme gazeuse (CO₂) ou directement dans le milieu de culture sous la forme de carbonate (HCO₃).

Le carbone représente environ 50% en masse de la matière sèche des microalgues (Sánchez Mirón et al. 2003). Chez les organismes autotrophes, la totalité de ce carbone est issue du CO₂. La production de 100 tonnes de biomasse algale permet donc la fixation d'environ 180t de CO₂ (Chisti. 2007).

-L'azote : ce composé est classiquement apporté sous 3 formes possibles : ammoniacque, nitrate ou urée. La forme « idéale » de l'azote est en fonction de la biologie des souches cultivées.

L'azote compte pour 7 à 10 % de la composition de la biomasse. C'est un élément indispensable au métabolisme cellulaire qui intervient notamment dans la synthèse de protéines fonctionnelles et structurales. Il est assimilé préférentiellement sous les formes ammonium (NH_4^+) et nitrate (NO_3^-), mais nitrites et urée pourront également répondre aux besoins azotés (Becker 1994).

- Le phosphore doit être apporté en fort excès car il tend à former des complexes avec les ions métalliques qui ne sont pas assimilables (Chisti 2000). Il représente environ 1% du poids sec de la cellule. Il intervient pour l'essentiel dans le transfert d'énergie (ATP), la synthèse des acides nucléiques et la formation de la membrane cellulaire. La forme orthophosphate (PO_4) est préférentiellement assimilée. Dans le milieu de culture, le phosphore est souvent considéré comme limitant. Sous forme ionique, il va en effet former des complexes avec la plupart des cations métalliques présents .

D'autres composés inorganiques sont déterminants dans l'activité métabolique du phytoplancton. Parmi ceux-ci, le potassium, qui est le cation le plus abondant dans le cytoplasme. Il intervient comme cofacteur enzymatique ainsi que dans les équilibres de charge des membranes. Le magnésium est indispensable au fonctionnement de la photosynthèse car il entre à la fois dans la composition de la chlorophylle et intervient comme cofacteur de la Rubisco (Pelmont, 2008; Becker, 1994). La plupart des éléments traces inorganiques (Br, Co, Cu, , Zn, Mo,) sont mobilisés dans la composition de l'appareillage enzymatique et participent à la biosynthèse de nombreux composés (Richmond, 2008). L'élément trace le plus indispensable est le fer. Il intervient dans des réactions enzymatiques fondamentales : au niveau des cytochromes des chaînes respiratoires, de l'assimilation de l'azote, de la synthèse de la chlorophylle et des acides nucléiques (Becker 1994). Enfin, un certain nombre de composés organiques sont identifiés comme des facteurs de croissance indispensables pour

certaines espèces qui sont incapables de les synthétiser. La cobalamine (vitamine B12) est fréquemment citée ainsi que la thiamine (Vitamine B1) et la biotine (Vitamine B7). Les bactéries hétérotrophes libres ou associées aux microalgues en relation symbiotique, subviennent à ces besoins en les excréant activement dans le milieu ou passivement au cours des lyses cellulaires (Croft *et al.* 2006 ; Droop, 2007).

- Les paramètres physico-chimiques :

En plus de l'approvisionnement en nutriments, de nombreux facteurs sont susceptibles d'influencer la croissance des microalgues : des facteurs abiotiques tels que la lumière, la température, la salinité, le pH, la teneur en O₂ et des facteurs biotiques tels que des pathogènes (bactéries, champignons, virus), des compétiteurs pour les ressources ou des prédateurs (hydres, copépodes , zooplancton).

Les facteurs abiotiques :

-La lumière :

Ce facteur constitue la source d'énergie primaire des microalgues en conditions photoautotrophes. La qualité (spectre adéquat avec la photosynthèse) et la quantité de lumière reçue peuvent être maximisées par le choix du site de culture, le mode de culture et l'intensité du mixage pour éviter la création de zones d'ombres stériles.

-La température :

Si les températures optimales sont bien caractérisées en laboratoire pour les différentes souches, l'impact des variations de la température, au cours de la journée et des saisons en extérieur, sur leur productivité n'est pas bien connu. De nombreuses microalgues tolèrent bien des températures inférieures à 15°C de leur optimum mais ne survivent pas à 2-4°C d'excès par rapport à leur température optimale (Mata et al. 2010).

-Le pH :

Le pH est principalement déterminé par la concentration en CO₂. Au fur et à mesure qu'il est consommé le pH augmente. La mesure du pH sert donc d'indicateur pour modérer les flux entrants de CO₂.

-La teneur en O₂ généré

L'O₂ généré par la photosynthèse peut atteindre une quantité 10g/m³/min (Chisti 2007). L'oxygène dissout à une action inhibitrice sur la photosynthèse et combiné avec de fortes intensités lumineuses, peut causer des dommages photo-oxydatifs aux cellules. La limite tolérable est d'environ 40% de la saturation du milieu.

1/g- Utilisation des microalgues

La diversité des espèces de microalgues et leur richesse en métabolites leur procurent un vaste panel dans de nombreuses applications comme le secteur de la santé, l'alimentation humaine(additifs et colorants alimentaire), cosmétique et pharmaceutique ainsi que l'alimentation animale et bioénergie .Les composés d'intérêt essentiellement identifiés sont les lipides , les protéines , les vitamines , les polysaccharides , les pigments , les antioxydants et d'autres composants cellulaires (person et al.2011).

- En alimentation humaine et animale

Depuis des millénaires, macroalgues et microalgues sont récoltées pour un usage alimentaire. Utilisée par les Mayas, la Spiruline est par exemple encore récoltée et consommée par les habitants des bords du lac Tchad. Si certains pigments sont utilisés comme colorants alimentaires (β-carotène, phicobiliprotéines), la contribution à la nutrition humaine des sociétés modernes reste essentiellement confinée à la nutraceutique (Milledge, 2011). Le phytoplancton en tant que producteur primaire des milieux aquatiques est par ailleurs tout « naturellement » exploité comme ressource nutritive pour l'aquaculture (Spolaore *et al.*, 2006).

Dans cette filière majeure de la production mondiale, les microalgues sont utilisées directement pour subvenir aux besoins des stades larvaires des mollusques bivalves et des crustacés (Muller-Feuga *et al.*, 2003) ou indirectement comme complément alimentaire et comme substrat pour le zooplancton, base alimentaire de nombreuses espèces aquacoles.

les microalgues sont connues pour leur production en pigments comme les caroténoïdes, dont la beta carotène ou l'astaxanthine produite par *Dunaliella* et *Haematococcus*. Ces biomolécules sont utilisées en tant que, colorants dans divers produits comme les glaces et les jus de fruits et en tant qu'additifs alimentaires sous le code E.160a (Person *et al.* 2011). Les microalgues sont également une source de vitamines A, B1, B6, D, E, K (Dabbadie L. 1992). *Chlorella sp.* est utilisée comme complément alimentaire pour sa richesse en protéines (Liu *et al.* 2005), en minéraux (Winston *et al.* 2003) ainsi qu'en acides gras (Matsunaga *et al.* 1999).

- Utilisation des microalgues dans le domaine pharmaceutiques :

A l'instar des plantes supérieures, un certain nombre de métabolites d'intérêt sont extraits d'une dizaine d'espèces exploitées industriellement à l'heure actuelle. Parmi ceux-ci, les caroténoïdes sont utilisés comme antioxydants (Astaxanthine) et comme colorants à usage alimentaire, pharmaceutique et cosmétique (β -carotène, phycobiliprotéines). Les lipides constituent également une très large classe de molécules que la plupart des microalgues peuvent accumuler en importantes proportions de leur poids sec. Les acides gras polyinsaturés – qui dans le milieu naturel se retrouvent concentrés dans les organismes marins en position inférieure dans la chaîne trophique – appartiennent à la classe des oméga-3 et oméga-6 comme les DHA et EPA. Egalement, des molécules élaborées par des diatomées, dinoflagellées et cyanobactéries font l'objet de travaux de recherche car elles présentent des propriétés anticancéreuses (Folmer *et al.* 2010). D'autres composés aux propriétés antifongiques, antibactériennes, antivirales et antihistaminiques comptent également parmi les molécules à intérêt pharmaceutique.

- Utilisation des microalgues dans le domaine cosmétique :

L'utilisation de certaines espèces de microalgues, en particulier *Arthrospira* et *Chlorella*, est bien établie dans le domaine cosmétique puisque elles représentent une source de biomolécules dotées de diverses activités : antioxydantes , anti-irritantes et hydratantes pour la peau (Person et al, 2011) . La phycocyanine extraite de *Spirulina sp.* est un pigment bleu utilisé dans l'industrie cosmétique comme colorant (Morice et Jamma ,1992).

De par leurs diverses natures (antioxydant, hydratant, colorant...), leurs extraits se retrouvent dans les crèmes anti-âge, les produits de soin rafraîchissants ou régénérant. En ce qui concerne les cosmétiques à base de lipides (comme les crèmes ou lotions), les extraits à l'éthanol ou au CO₂ supercritique prennent une ampleur commerciale non négligeable. L'utilisation d'acides aminés semblables à la mycosporine est utilisée comme filtre UV naturel très efficace dans les écrans solaires.

- Utilisation des microalgues dans la santé humaine :

De nombreux métabolites d'origine algale montrant une activité biologique intéressante pour des applications en médecine et en pharmacie, ont été isolées ces dernières années (Smit, 2004 ; carlsson et al, 2007 ;person et al , 2011) . En effet certaines molécules montrent une activité antivirale ; c'est le cas des molécules extraites de *Dictyota dichotoma* et *Caulerpa prolifera* (ballesteros et al, 1992) et de *Sargassum micracanthum* (Blunt et al , 2007) , *Padina arborescens* , *sargassum patens* , *Caulerpa* et *Hypnea charoides* montrent notamment une action contre les virus herpes (Smit,2004). Un polysaccharide sulfaté (naviculane) extrait de *Navicula directa* montre une action antivirale contre le virus herpes et le virus responsable de la grippe (Prestegard et al, 2009).

- En agriculture

Les microalgues apparaissent également comme de bons fertilisants de sols pauvres puisqu'elles apportent notamment du potassium, de l'azote et des éléments essentiels à la croissance végétale. Elles permettent aussi de capturer et de garder l'humidité du sol.

- Dans l'environnement

Traitement des effluents liquides

Etant donné que leurs conditions de croissance et leur activité métaboliques requièrent de l'eau et des éléments nutritifs (macro et micro-éléments), les microalgues ont la capacité de croître sur une vaste gamme d'effluents. La littérature scientifique rapporte un grand nombre de gisements auxquels les microalgues furent confrontées avec succès: eaux résiduaires urbaines, effluents d'élevages (Mulbry *et al.*, 2008) et effluents industriels comme les digestats (Levine *et al.*, 2011) ou encore les lixiviats de décharges (Lin *et al.*, 2007)

- Traitement des polluants métalliques :

Les métaux lourds sont indispensables au métabolisme de tous les êtres vivants à l'état de trace. Les ions métalliques se révèlent toxiques pour des concentrations excessives. A la différence des polluants organiques, ils sont non biodégradables et s'accumulent dans les organismes vivants, directement ou concentrés via la chaîne trophique, et expriment alors leur toxicité. Ils sont transférés en excès dans le milieu naturel portés dans les rejets d'un grand nombre d'activités industrielles (métallurgie, exploitation minière, production de fertilisants et de pesticides,...). Le traitement de ces métaux en solution se réalise couramment via des techniques physico-chimiques (précipitation/chélation, filtration membranaire...) et biologiques. Parmi ces dernières solutions, les microalgues se distinguent à la fois par une certaine tolérance à la présence de ces métaux et des rendements importants de fixation. A ce titre et étant donné leur position dans la chaîne trophique des milieux aquatiques, ces organismes sont utilisés comme indicateurs écotoxicologiques

de la qualité des eaux vis-à-vis des métaux lourds notamment. Monteiro *et al.* (2012) décrivent un mécanisme de fixation des métaux qui se décompose en deux temps :

- Adsorption : l'adsorption peut se réaliser directement sur la paroi des cellules et/ou indirectement dans un mucus exo-polysaccharidique. Cette première étape, rapide et réversible, mobilise les charges portée par les groupes fonctionnels chargés négativement portés par la paroi.
- Assimilation dans le cytoplasme : cette réaction est plus lente, mobilise un mécanisme actif et est irréversible. Les ions rejoignent leur destination et leur fonction métabolique ou expriment leur toxicité.

- Traitement des effluents gazeux

Le CO₂, identifié comme le gaz contributeur majeur à l'effet de serre, voit sa concentration en constante augmentation dans l'atmosphère depuis la révolution industrielle. Avec un impact avéré sur le réchauffement climatique, cette problématique a notamment motivé la recherche de solutions de piégeage de ce gaz avant sa libération et sa dilution dans l'atmosphère. Parmi ces technologies envisageables, sont étudiées les procédés physiques (capture et stockage du CO₂) et les solutions biologiques de fixation. Les solutions physiques de capture et de stockage se révèlent toutefois particulièrement coûteuses mais font l'objet de nombreuses expérimentations aux échelles pilotes et pré-industrielles. La croissance des microalgues en conditions non limitantes en carbone compte parmi les enjeux clés de la production de masse (Benemann et Woertz, 2012). L'utilisation de la photosynthèse pour la fixation de CO₂ répond ainsi à la fois à un enjeu environnemental du point de vue des activités industrielles particulièrement émettrices et à un enjeu économique sur le versant culture de masse des microalgues. Ainsi le CO₂ qui est une contrainte environnementale peut devenir une opportunité de production microalgale.

Les microalgues peuvent être efficacement utilisées dans le traitement et l'épuration des eaux usées car elles jouent un rôle de dépolluant en absorbant les excès de nutriments, en captant les polluants et en fixant le CO₂ ou les oxydes

d'azote NO_x et de soufre SO_x (Centre D'étude et De valorisation Des Algues, 2011).

1/h -Production d'énergie

-

La production d'énergie à partir de microalgues est sans aucun doute le moteur de l'engouement et des activités de recherches croissantes mobilisées autour du potentiel offert par ces organismes depuis le début du XXI siècle. A l'instar des gisements de biomasses mobilisés dans les filières bioénergies, et du fait d'une expression phénotypique métabolique identique aux plantes supérieures, les travaux portant sur la valorisation énergétique des microalgues concernent pour l'essentiel les mêmes filières. D'autres voies sont également explorées, comme la production directe d'hydrogène.

La biomasse sèche peut servir à produire de l'énergie par combustion directe (Kadam, 2002) liquéfaction, ou hydrogénation de ces organismes permettant de produire un biocarburant gazeux ou une « huile » brute par conversion thermochimique (Miao et Wu, 2004). Méthane et éthanol peuvent être produits par conversion biochimique à partir de la biomasse ou de la fermentation des sucres accumulés dans la cellule (Sialve *et al.*, 2009). Enfin, les lipides intracellulaires peuvent être extraits par séparation chimique pour intégrer une filière biodiesel après transesterification (Hu *et al.*, 2008). Dans ce champ des possibles, les filières lipides, éthanol carburant et méthanisation sont les voies qui suscitent le plus d'intérêt et, a priori, de grands potentiels de développements industriels. En effet, comme pour les autres gisements de biomasse, ces formes d'énergie peuvent compléter ou se substituer à la plupart des énergies fossiles (gasoil, essence et gaz naturel) et bénéficier des mêmes filières de valorisation, réseaux de distribution et stockage.

- Microalgues biodiesel et hydrocarbures

La production de biodiesel à partir d'huile d'algue a reçu un regain d'attention au cours de la dernière decennie, principalement grâce à la productivité avancée pour certaines espèces oleagineuses dont la biomasse peut être composée, dans certaine condition de carence, de plus de 50% de lipides . (Person et al. 2011). Le genre *Nannochloropsis* avec ses différentes espèces est le meilleur candidat pour la production de biodiesel car il peut accumuler une grande quantité de lipides. *Nannochloropsis sp.* (Rodolfi et al , 2009 ; Pal et al,2011 ; Bondioli et al ,2012) , *N.gaditana* (Simionato et al, 2011,2013) , *N.oculata* (Van Vooren et al,2012) , *N.salina*(Sforza et al,2012) , *N.oceanica* (Dong et al ,2013 ; Pal et al,2013 ;Bongeovani et al,2013 ; Solovchenko et al ,2014) en sont les représentants.

Leurs performances « biologiques » et la variété des espèces prédisposent les microalgues à se positionner dans la course aux énergies renouvelables. En effet, les bioénergies, ou les combustibles pouvant être produit à partir des microalgues couvrent une large gamme allant des composés gazeux comme l'hydrogène et le méthane aux alcools et aux hydrocarbures liquides conventionnels. Les bioénergies les plus ciblées restent, du fait de leur forte densité énergétique, les carburants de transport liquides : essence, diesel ou kérosène. Ce sont les principaux produits actuellement créés à partir du pétrole brut pour le secteur des transports, qui peuvent être remplacés par d'autres carburants issus de la biomasse.

-*Éthanol* : L'éthanol est généralement produit à partir de matières premières contenant des sucres ou de l'amidon ; certaines algues peuvent contenir plus de 50% d'amidon. Les parois cellulaires des algues sont composées de polysaccharides. Ils peuvent être utilisés comme matière première dans un processus similaire à la production d'éthanol cellulosique, avec l'avantage supplémentaire que les algues ne contiennent que rarement de lignine et ces polysaccharides, sont généralement plus facilement décomposables que la biomasse ligneuse. Des coproduits peuvent potentiellement être tirés de la partie non-carbohydratée de la biomasse algale.

Biogaz : La production de biogaz issu de la digestion anaérobie des micro-algues est un mode de production de biocarburants gazeux intéressant. À ce jour, c'est probablement la filière la plus aboutie, tant sur le plan économique que technique, dans le domaine de la valorisation énergétique des microalgues.

Dans ce registre les microalgues sont facilement transformables. Il suffit, en effet, de récolter une biomasse humide directement méthanisable par biodigestion. L'utilisation de cette technologie de conversion élimine, alors, plusieurs obstacles, responsables des coûts actuels élevés associés aux biocarburants d'algues, en particulier le séchage, l'extraction et la conversion du combustible. Cette approche peut être très efficace pour des situations comme le traitement intégré des eaux usées, où les algues sont cultivées dans des conditions non contrôlées en utilisant des souches non-optimisées pour la production de lipides.

Le biogaz, après purification et concentration en méthane, peut se substituer au gaz naturel et être soit injecté dans le réseau de gaz naturel, soit être distribué pour une utilisation en tant que bio-méthane carburant

Bioélectricité : La biomasse des algues peut également subir une co-combustion dans une centrale électrique.

Pour cela, la biomasse a besoin d'être séchée, impliquant une quantité importante d'énergie. Ce procédé est donc seulement intéressant si la biomasse doit être séchée pour l'extraction d'un coproduit donné dans une première étape avant d'être utilisée comme biocarburant. Mais cette voie de valorisation ne présente pas un grand intérêt.

-Dihydrogène : La production d'hydrogène provenant de microalgues a reçu beaucoup d'attention depuis plusieurs décennies. Les technologies de production biologique de dihydrogène (c'est-à-dire de bio-hydrogène) offrent un large éventail d'approches pour en produire, comprenant l'hydrogène photosynthétique, la photo-fermentation.

La technique la plus porteuse d'espoir a émergé des algues et cyanobactéries lorsqu'il a été découvert que ces organismes photosynthétiques pouvaient produire de l'H directement à partir de la lumière solaire, du CO₂ et de l'eau.

Cet « hydrogène photosynthétique » présenterait de nombreux avantages là où les autres technologies ont essentiellement des inconvénients. Là où les autres technologies sont émettrices de CO₂, celle-ci permet au contraire de le capter pour en faire de la biomasse. Là où les autres techniques demandent beaucoup de ressources ou énergies non renouvelables, celle-ci ne dépend que de la lumière solaire, de l'eau et du CO₂ (et de quelques sels minéraux).

Cependant cette perspective reste virtuelle car de nombreux problèmes technologiques restent à résoudre. Notamment le fait qu'à l'état naturel, la production d'H₂ des algues est faible, transitoire et indissociable de conditions de stress non favorables à la survie des algues. En effet l'H₂ n'est pas une biomolécule d'intérêt pour la cellule algale, les souches sauvages n'ont donc pas d'intérêt particulier à se retrouver dans de telles conditions de stress. C'est en ce sens qu'il est encore prématuré d'imaginer des possibilités de coproduction d'hydrogène.

À l'avenir cela pourrait aussi mener à des systèmes où des coproductions seraient envisageables.

De plus, les microalgues présentent de nombreux avantages par rapport aux végétaux producteurs de biocarburants de première et de deuxième génération : une capacité à accumuler plus de 50% de leur poids sec en acide gras ; des rendements à l'hectare supérieurs aux espèces oléagineuses terrestres ; des surfaces nécessaires plus faibles, et non arables ; une possibilité d'utiliser de l'eau de mer ; une meilleure capacité de remédiation du CO₂.

- Utilisation des microalgues dans l'industrie chimique

L'industrie chimique est actuellement fortement dépendante du pétrole fossile, à partir duquel sont extraits des produits chimiques, les matières plastiques et les carburants de transport. L'industrie chimique montre quelques similitudes importantes avec l'industrie des carburants, tels que le faible prix de la matière première de base fossile et l'utilisation d'hydrocarbures. Leur remplacement par

des produits d'origine biologique n'en est qu'à ses balbutiements en raison de leur spécificité et de leur coût encore trop élevé.

-Bioplastiques

Un exemple d'applications des cyanobactéries en biotechnologie est celui de la production de bioplastiques. En effet, plusieurs souches de cyanobactéries (comme par exemple la bien connue spiruline) peuvent accumuler des polyhydroxyalkanoates, qui peuvent être utilisés comme un substitut aux plastiques d'origine pétrochimique non biodégradables.

2/Nannochloropsis sp

Le genre *Nannochloropsis* (Fig.13) a été décrit pour la première fois par Hibberd (1998) il fait partie de la classe des Eustigmatophyceae et de la famille des monodopsidaceae. Cette microalgue appartenant surtout au milieu marin, se trouve également dans l'eau douce et saumâtre (Fawley et Fawley, 2007). Le genre *Nannochloropsis* comprend 6 espèces : *N. oculata*, *N. gaditana*, *N. granulata*, *N. limnetica* (Hibberd, 1981 ; Lubian, 1982 ; Karlson et al, 1996 ; Krietz et al, 2000 et Suda et al, 2002 respectivement) qui ont été déterminés par analyse des séquences d'ADN basée sur l'ADN_r 18S et le gène *rbcL* qui se trouve dans le génome chloroplastique (Fawley et Fawley, 2007 ; Karlson et al, 1996 ; Andersen et al, 1996 ; Suda et al, 2002 ; Vieler et al, 2012 ; Cao et al, 2013 et Wang et al, 2014).

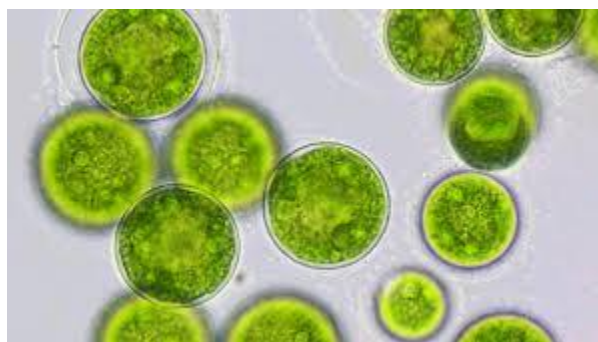


Figure.13 : *Nannochloropsis gaditana*

2/a- Structure de *Nannochloropsis*

Le genre *Nannochloropsis* est composé des espèces unicellulaires de très petites taille environ 2 à 5 µm (Kandilian et al, 2013). Ces microorganismes sont des sources de différents pigments comme la chlorophylle a, la zéaxanthine, la canthaxanthine et l'astaxanthine (Lubián et al, 2002). Les espèces ont des formes très variables. En effet, les cellules de *N.granulata* ont une forme globulaire à ovale alors que *N.salina* et *N.gaditana* ont une forme cylindrique ; *N.ocularata* quand à elle a une forme sphérique. Par ailleurs la description de l'espèce *N.limnetica* et *salina* n'est pas établie (Suda et al, 2002 ; Fawley et Fawley, 2007). Ces espèces ont été déterminées par une analyse des séquences d'ADN basée sur l'ADNr 18S et le gène *rbcL* qui se trouve dans le génome chloroplastique (Fawley et Fawley, 2007 ; Karlson et al, 1996 ; Andersen et al, 1996 ; Suda et al, 2002 ; Vieler et al, 2012 ; Cao et al, 2013 et Wang et al, 2014). Cependant l'étude du génome total de *N. salina* et *N. gaditana* montre que se sont deux souches de la même espèce vu que la différence entre leur génome est inférieure à 20% (Shawn, 2014)

2/b- Intérêt de *Nannochloropsis* sp.

Nannochloropsis est une algue industrielle robuste, qui a été largement développée dans les bassins extérieurs et photobioréacteurs pour l'aquaculture (Sukenik et al, 2009 ; Rodolfi et al, 2009). L'espèce *N. oculata* (Renaud et al, 1991) et *N.gaditana* (Ferreira et al, 2009) sont utilisées pour leur richesse en acide eicosapentanoïque. Ces microalgues sont à ce jour, le meilleur aliment pour les rotifères (*Brachionus plicatilis*), du fait de leur capacité à accumuler plusieurs types d'acides gras hautement insaturés (AGHI) qui sont essentiels pour les larves de poissons de mer et sont fournies à eux par les rotifères (Shigehisa Yamasaki et al, 1989). En outre *Nannochloropsis* est riche en protéines de haute qualité (Volkman et al, 1993) et en acide gras oméga-3, possédant de nombreux bienfaits pour la santé (Lee et al, 2009 ; Kiliana et al, 2011). L'espèce *Nannochloropsis gaditana* qui fait l'objet de notre étude, est aussi envisagée comme additif dans l'alimentation du bétail en Algérie, en

raison de sa richesse en différentes biomolécules comme les lipides, les protéines et les polysaccharides.

3/La cellulose

3/a -Généralités

La cellulose a été découverte en 1838 par le chimiste français Anselme Payen (Payen A, 1838). Ce polysaccharide est le constituant majeur des organismes photosynthétiques, il assure la protection et le soutien chez les végétaux. On le rencontre également dans un grand nombre d'autre organismes vivants comme certaines algues (*Valonia*), quelques champignons (*Allomyces*, oomycètes (*Saprolegnia*)) , des bactéries, certains protozoaires (*Dyctostelium discoideum*) et des procaryotes comme *Acetobacter* ou *rhizobium*. La cellulose est présente également dans le monde animal, notamment dans la tunique d'animaux marins comme les tuniciers et les salpes (Brown, 1996).

3/b -Structure chimique de la cellulose

La formule brute exacte de la cellulose ($C_6H_{12}O_5$) a été déterminée par Willtatter et Zechmeister (1913). L'élucidation de sa structure polymère daté de 1926 avec les travaux de Staudinger (Fig.14). Pui des travaux sur la structure du glucose et du cellobiose (Haworth, 1925 ; Charlton et al., 1926 ;Haworth et Leaner ,1928) et des expériences de dégradation chimique partielle de la cellulose ou de ses dérivés (Irvine et Hirst , 1922 ; Friese et Hess, 1927) ont permis d'établir que la cellulose est un homopolymère constitué d'unités D-anhydroglucopyranose liées entre elles par des liaisons glycosidiques B-(1-4) (figure. 3). Des investigations plus récentes ont montré que les maillons de D-glucopyranose avaient une conformation chaise 4C_1 (Chu et Jeffrey,1968). L'unité répétitive, composée de l'association de deux glucoses liés en B-(1-4) est appelée cellobiose et les groups hydroxyles à chacune des deux extrémités de la chaine ont un

comportement différents. Une extrémité réductrice (C-1 ouvert) dont l'hydroxyle en position anomérique est libre et la forme hémiacétal est en équilibre avec la forme aldéhyde réductrice minoritaire. L'extrémité non réductrice (C-4 fermé) est nommée ainsi car le groupement hydroxyle anomérique est engagé dans une liaison osidique.

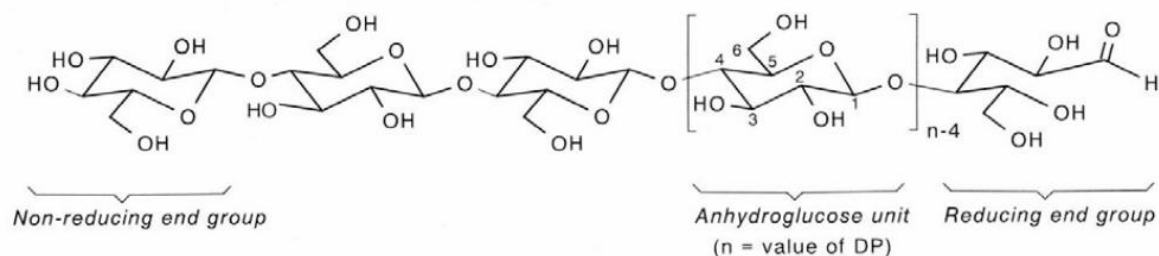


Figure.14 : Structure chimique de la cellulose

3/c- Intérêt de la cellulose

Bien que la cellulose ait été utilisée pendant des siècles dans des applications très diversifiées, grâce à la découverte de sa composition chimique, sa structure et sa morphologie elle devient aujourd'hui le polymère organique le plus produit dans les industries. Les poudres cellulosiques sont utilisées dans l'industrie pharmaceutique, cosmétique, alimentaire et dans la fabrication de la peinture.

Dans le domaine pharmaceutique elles sont utilisées comme excipient pour la fabrication des comprimés ainsi elle est considérée comme lubrifiant et désintégrant pour les formes solides telle que les comprimés (Ribet J, 2003).

Les dérivés cellulosiques comme la carboxyméthyle cellulosiques sont aussi utilisées dans l'industrie alimentaire (Thomas et Pourcelot, 1993). Ses fonctions sont nombreuses et elle est mise en œuvre en tant que : liant, diluant et désintégrant.

Les éthers de cellulose, comme l'hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) est l'un des excipients le plus étudié. L'HPMC est un polymère hydrophile non

ionique préparé par traitement de la cellulose provenant de la pulpe de bois ou des fibres de coton avec des produits alcalins et avec de l'oxyde de propylène (Wade et Weller, 1994).

Les fibres de cellulose sont utilisées sous forme de fibres brutes pour la fabrication de pâte à papier ou elles sont également employées après transformation dans l'industrie chimique pour la fabrication du plastique (Acétate de cellulose, cellophane), ainsi que dans la fabrication de fibres textiles artificielles (Binet et al, 2011).

4/les hémicelluloses

4/a- La structure chimique des hémicelluloses

Les hémicelluloses sont une famille de composés hétéropolysaccharidiques composés de sucres à cinq carbone (principalement arabinose et xylose) ou six carbones (glucose, mannose et galactose) (fig.3). La structure chimique de la fraction hémicellulosiques varie d'une espèce à une autre. Néanmoins, les hémicelluloses les plus courantes dans la biomasse lignocellulosique sont issues de la famille des xylanes, des mannanes et des galactanes

Les xylanes possèdent une structure β -1,4- xylose qui contient des motifs arabinose et des motifs acide glucuronique . Les mannanes possèdent quant à elle une structure β -1,4-mannose. Enfin, les galactanes sont composés d'une structure β -1-4 galactose hautement substituée par des motifs xylose , galactose , arabinose, ou encore fucose (Dhepe et Sahu,2010)(Fig.15). De même que pour la cellulose , les hémicelluloses possèdent un grand nombre de fonctions hydroxyles .

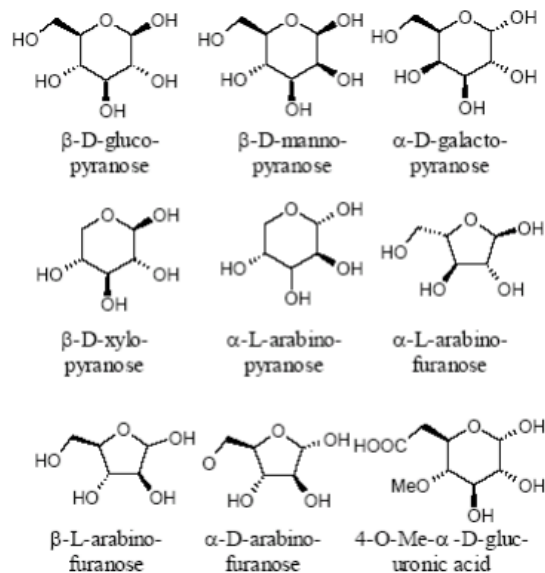


Figure.15: Principaux glucides constituant les hémicelluloses .

4/b -Intérêt des hémicelluloses

Dans le domaine de l'industrie : comme ressources renouvelables, les hémicelluloses sont promises à un bel avenir industriel avec des produits comme des additifs alimentaires, des plastiques, des produits cosmétiques ainsi que les produits pharmaceutiques (Gatenholm et Tenkanen, 2003). Ces polysaccharides dans la paroi cellulaire jouent un rôle essentiel dans l'interaction avec d'autres polymères pour assurer les propriétés de stabilité et de protectrice de la paroi végétale (Scheller et Ulvskov, 2010).

L'hydrolyse des hémicelluloses conduit à des sucres, principalement des pentoses, qui peuvent être chimiquement ou biochimiquement convertis en éthanol ou en multitude de produits chimiques.

Dans l'industrie alimentaire, sont utilisées notamment les galactomannanes dans les produits de boulangerie, les produits laitiers, les sauces et d'autres produits alimentaires. L'application industrielle non alimentaire pour ce polysaccharide est réservée à l'industrie du textile, du papier, de la cosmétique et pharmaceutique (Wertz J-L, 2011).

Les parois cellulaires végétales sont des réservoirs potentiels de polysaccharides biologiquement actifs (Hensel et al, 1998). La littérature est abondante à ce propos et témoigne de l'intérêt des hémicelluloses et en particulier des xylanes dans ce domaine. Des propriétés antioxydantes de xylanes ont été reportées sur des extraits de sauge (Capek et al, 2009), de diverses plantes médicinales guimauve officinale, rudbeckie et mahonia (Kardosová et Machová, 2006). Dans ces deux derniers cas, il s'agissait d'arabinoxylane possédant de très fortes activités antioxydantes.

D'autre glucuronoxylanes et des hétéroxylanes issus de plantes médicinales ont respectivement présenté des activités anti-tussives (Kardosová et al, 2002) et des effets antiulcéraux (Cipriani et al, 2008). Les xylanes sulfatés, présentent des propriétés anticoagulantes et anti VIH (Stone et al, 1998 ; Yoshida et al, 2001).

5/La lignine

La lignine est le polymère naturel le plus abondant dans la nature après la cellulose. Sa biosynthèse au sein de la matière végétale est assurée par un couplage de trois monomères alcool phénylpropane différents : les alcools coumaryliques, coniféryliques et sinapyliques (fig.16). La synthèse de lignine est réalisée dans la nature par l'action d'enzymes qui après polymérisation oxydatives des trois monomères forment les unités ou noyau p-hydroxyphényle (H), guaiacyl (G) et syringyl (S). Sa structure très complexe (Freudenberg, 1968 ; Adler 1977 ; Tiainen, 1999) a été étudiée pendant de nombreuses années et reste toujours délicate à élucider.

L'abondance des trois monomères précurseurs de la biosynthèse de la lignine diffère selon l'origine des plantes, ils sont liés entre eux par des liaisons carbone – carbone telles les liaisons β -5, β -1, 5-5', β - β , α - β et par des liaisons éthers aryles, type α -O-4 et β -O-4 (figure.13) (Adler, 1977), ce sont les

substances polyphénoliques les plus abondantes chez les végétaux (Fengel et Wegener, 1984 ; Chen, 1991 ; Sarkanen et Ludwig, 1971).

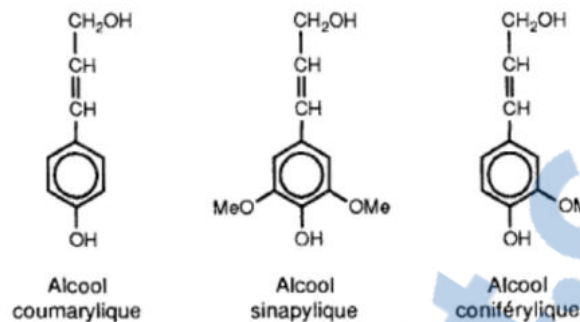


Figure 16 : Représentation des trois unités composantes la lignine

La lignine joue le rôle de lien entre les molécules de cellulose et d'hémicellulose. Elle assure la rigidité et la protection contre les dégradations biologiques de la matière végétale. Ces liens sont principalement des liaisons covalentes de type ether (lignine-cellulose) et ester (lignine – hémicellulose).

6/ L'holocellulose

L'holocellulose est un mélange des constituants cellulosiques et hémicellulosiques : c'est le résidu solide d'une délignification du bois qui est réalisée avec du chlorite de sodium NaClO₂ (Duret et al, 2011).

7/Microalgues et métaux lourds

Avec l'accélération du développement économique, l'homme est de plus en plus responsable de la pollution de l'environnement. La diversité des produits d'origine industrielle conduit à une augmentation considérable du nombre de substances totalement étrangères au monde vivant, dites xénobiotiques. Certains de ces polluants ont contaminé les sols, les mers et l'air. Ces polluants proviennent des décharges, des installations industrielles, comme conséquence d'accidents de transport ou encore par le biais des rejets urbains et industriels ou en raison de pratiques agricoles utilisatrices de pesticides. Les microorganismes en général éliminent plus ou moins rapidement les polluants organiques

biodégradables, mais les métaux lourds (cadmium, cuivre, mercure, plomb et zinc) et les métalloïdes (sélénium et arsenic) persistent dans l'environnement et s'accumulent inévitablement. Ils peuvent migrer vers les eaux de surface ou souterraines ou pénétrer la chaîne alimentaire via les végétaux pour se retrouver dans les animaux et éventuellement dans l'homme. Lorsque le risque pour les écosystèmes et l'homme est très élevé la dépollution s'impose. Il existe des méthodes physicochimiques permettant la décomposition des polluants. Les plus utilisées sont l'incinération et les méthodes de décomposition chimiques. Elles sont très efficaces pour certains contaminants présents dans le milieu mais présentent des inconvénients. Les interventions sont lourdes et onéreuses et peuvent détruire le milieu naturel en éliminant tout être vivant présent dans ce milieu.

La bioremédiation, c'est-à-dire l'emploi de procédés biologiques pour éliminer les polluants industriels qui contaminent le cycle biogéochimique des substances naturelles, est une option avantageuse pour diminuer la pression exercée sur l'environnement.

Le procédé de bioremédiation consiste à activer la capacité naturelle que possèdent de nombreux organismes, la plupart du temps microscopiques (bactéries, champignons et récemment microalgues), à dégrader les polluants en composés inertes tels que l'eau et le gaz carbonique. Ces organismes peuvent être indigènes (déjà présents dans la zone polluée), ou exogènes (ajoutés au milieu), ou encore être prélevés sur le site contaminé, cultivés en laboratoire puis réintroduits dans le sol (bio augmentation).

La bioremediation est une option qui offre la possibilité de détruire ou de rendre moins toxiques les polluants, en utilisant des activités biologiques naturelles. Les microorganismes sont utilisés depuis environ un siècle pour le traitement des eaux usées et des compostes. Ce qui est nouveau, c'est l'utilisation de ce procédé microbiologique pour nettoyer les sols, les eaux souterraines les estuaires etc.

Les systèmes sont différents en raison de la nature du polluant ou du milieu où se déroule la dégradation. Les sites sont fréquemment contaminés par un mélange

de composé très complexes, comme les huiles minérales ou les solvants industriels, à cela s'ajoutent des polluants inorganiques comme les métaux lourds qui font l'objet de notre travail.

Le but de ce travail est de voir le comportement de *Nannochloropsis gaditana* face à différents métaux lourds (Fe, Cu et Cd) et étudier son pouvoir de biosorption de ces métaux lourds.

Les activités humaines modifient très significativement la répartition des ETMs (éléments traces métalliques), et des formes chimiques sous lesquelles ils sont présents dans l'environnement (Miquel, 2001). Les activités industrielles surtout automobiles rejettent des fines particules dans l'atmosphère, lesquelles peuvent être rejetées dans les milieux aquatiques. Les métaux peuvent diffuser directement à travers la surface de l'eau grâce à la surface d'échange entre l'atmosphère et la colonne d'eau (Ridame et al., 1999), comme ils peuvent aussi bien être mélangés avec les eaux de ruissellement. Ces eaux contiennent les métaux provenant des phénomènes de corrosion des surfaces en contact avec les eaux de ruissellement. Les métaux peuvent aussi être acheminés vers la mer via les cours d'eaux et les égouts, pour s'accumuler par la suite en grande partie dans les sédiments, et se bioaccumuler dans les organismes marins.

7/a-Eléments traces métalliques (ETMs)

-Définition et répartition des ETMs

Par définition, un métal est un élément chimique, le plus souvent issu d'un minéral, doté d'un état chimique particulier. Il possède des propriétés de conduction de chaleur et d'électricité, à des caractéristiques de dureté et de malléabilité, et se combine aisément avec d'autres éléments pour former des alliages utilisés par l'homme. Si les métaux sont souvent indispensables au déroulement des processus biologiques (oligo-éléments), nombre d'entre eux peuvent s'avérer toxiques ou dangereux pour diverses formes de vie, lorsque leurs concentrations dépassent un seuil, lui-même fonction de l'état chimique

(spéciation) de l'élément considéré. C'est le cas par exemple du fer (Fe), du cuivre (Cu), du zinc (Zn), du nickel (Ni), du cobalt (Co), du vanadium (V), du sélénium (Se), du molybdène (Mo), du manganèse (Mn), du chrome (Cr) et du titane (Ti) (Miquel, 2001). D'autres métaux tels que le mercure (Hg), le plomb (Pb), le cadmium (Cd) et l'antimoine (Sb) ne sont pas nécessaires à la vie; leur présence à partir de très faibles concentrations est généralement préjudiciable (Chiffoleau et al., 2001).

L'appellation "éléments traces métalliques" (ETMs), ou par extension, "éléments traces" (Miquel, 2001), est communément utilisée pour désigner les éléments métalliques présents en très faibles concentrations (traces) dans l'environnement. A l'état naturel, les ETMs sont des micropolluants capables d'entraîner des nuisances. Leur toxicité se développe par bioaccumulation le long de la chaîne alimentaire.

Les ETMs sont présents dans tous les compartiments de l'environnement, par nature (sources naturelles), ou parce que certaines activités anthropiques favorisent leur dispersion (source anthropique). Les concentrations en ETMs dans la phase aqueuse sont moindres par rapport à celles existant dans la phase solide. Ainsi, la sédimentation des dépôts métalliques particuliers au fond des lits des cours d'eau ou des zones côtières conduit potentiellement à une accumulation dans les sédiments.

7/b-ETMs et phytoplancton

- Absorption des ETMs par le phytoplancton

A faibles teneurs, certains ETMs (Mg, Fe, Mn, Zn, Co, Cu et Mo) sont nécessaires au métabolisme cellulaire des êtres vivants. Ils agissent, par exemple, comme co-facteurs dans le maintien de l'activité enzymatique, et au cours des réactions biochimiques vitales pour les cellules. Concernant le phytoplancton, l'absorption d'un métal par une cellule phytoplanctonique se fait au niveau de sa paroi, et implique les étapes suivantes : en premier lieu, le transport du métal depuis la solution vers la surface de la membrane cellulaire,

puis, sa fixation sur les sites de transport, et enfin, l'assimilation du métal par la cellule lors du passage au travers de la membrane lipidique (Hudson, 1998). Trois mécanismes principaux assurent le transport des métaux au travers des membranes biologiques (Fig.17) :

► La diffusion simple

► La diffusion facilitée par les composants de la membrane cellulaire, qui peuvent être des canaux ioniques intégrés dans la membrane, ou des ligands extracellulaires. Ces derniers sont des molécules liposolubles tels que des complexes avec les lipides, ou des citrates, qui favorisent le passage des métaux au travers des membranes cellulaires (Errécalde et Campbell, 2000)

► Le transport actif, gouverné par un gradient de potentiel au travers de la membrane cellulaire

L'interaction entre les ETMs et le phytoplancton est régie par la physico-chimie du milieu, lequel pourra avoir un effet sur la répartition entre les différentes formes chimiques métalliques, et leur assimilation par les producteurs primaires (Greene et Darnall, 1988; Crist et al., 1990, 1992).

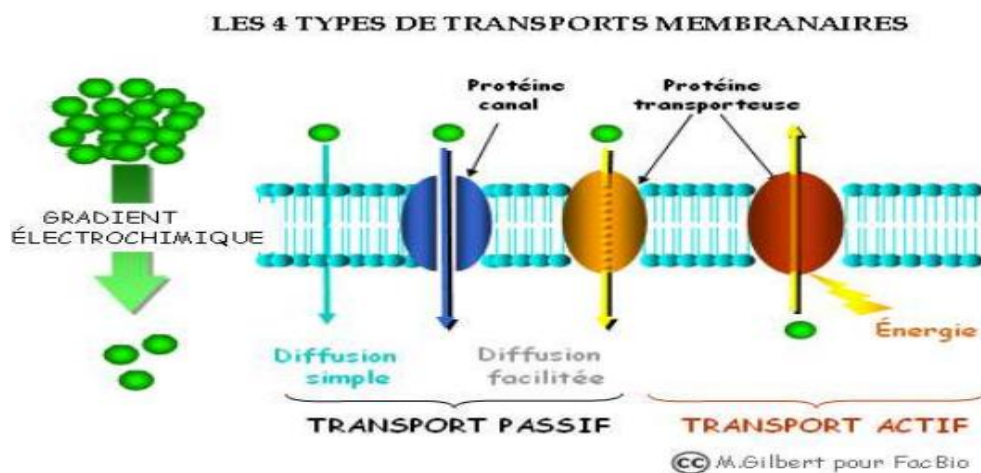


Figure.17 : Mécanismes de transport membranaire

- Effets des ETMs à fortes concentrations sur le phytoplancton .

Certains métaux comme le zinc et le cuivre, deviennent nuisibles pour le phytoplancton, alors que d'autres sont toujours toxiques, comme le plomb et le cadmium (Ling et al., 2009; Poirier et al., 2009). Il a été montré que la

spéciation gouvernait la toxicité du métal. En effet, un métal sous forme cationique, donc libre (ex : Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+}) est plus réactif avec les espèces neutres, car il est biodisponible et, donc, rapidement assimilé par les organismes vivants chez lesquels il peut induire des effets néfastes (Vasconcelos et Leal, 2001).

Les effets des contaminants métalliques sur le phytoplancton ont largement été étudiés lors d'expérimentations impliquant des espèces microalgales maintenues en cultures en présence de métaux. Dans ce contexte, les ETMs ont montré divers effets au niveau cellulaire, les métaux pouvant affecter la croissance, la photosynthèse, la respiration, l'assimilation des nutriments, et pouvant même induire la mort cellulaire. C'est ainsi que l'augmentation des teneurs de dix métaux (Cu, Zn, Ni, Cr, Pb, Cd, Hg, As, Sb et Se) inhibait la croissance de la diatomée *Thalassiosira aestivalis* mise en culture (Thomas et al., 1978). D'autres auteurs ont mis en évidence l'effet inhibiteur du cadmium sur la croissance de la diatomée *Chaetoceros tenuissimus* (Desai et al., 2006). Ces auteurs ont observé qu'en présence d'une concentration de 10 mg Cd L^{-1} , 65% des cellules de cette espèce ont été endommagées, et 50% des cellules étaient apoptotiques au bout de 8 jours de contamination. La tolérance des microalgues aux ETMs ne varie pas seulement entre les espèces et les classes phytoplanctoniques, mais aussi en fonction de leur milieu de vie. En effet, Gavis et al (1981) ont conclu que les espèces vivant dans des environnements néritiques étaient plus tolérantes que les espèces des eaux océaniques. De même, Murphy et Belastoch (1980) ont montré que les espèces provenant des environnements néritiques étaient moins sensibles aux polluants métalliques que celles originaires des environnements océaniques.

- Mécanismes de défense mise en place par le phytoplancton contre la contamination métallique

Certaines espèces de microalgues sont capables de survivre dans des milieux où les concentrations en métaux traces sont très élevées (Pawlik-Skowronska, 2001). Cette résistance dépend de nombreux facteurs comme la nature du métal,

les conditions du milieu et la capacité des microalgues à se « défendre ». Les mécanismes de défense employés par le phytoplancton, pour faire face aux contaminants métalliques, sont principalement :

Le développement des pompes ATP-dépendantes qui assurent une faible concentration en métaux dans le milieu intracellulaire (Gonzalez-Davila et al., 1995), Un changement intracellulaire du degré d'oxydation des métaux (Gouvêa et al., 2005), ce qui conduit à des formes métalliques moins toxiques (Pawlik-Skowronska, 2001), La complexation entre les ions métalliques et les ligands intracellulaires tels que les acides gras, les polypeptides et les aminoacides, ce qui permet de diminuer la toxicité (Gonzalez – Davila et al., 1995), Une précipitation des complexes métalliques à la surface des cellules, ou la libération d'exsudats ayant de fortes propriétés complexantes, permettant de modifier la biodisponibilité des métaux (Gouvêa et al., 2005). La stratégie de défense impliquant l'excrétion des molécules extracellulaires par le phytoplancton est très étudiée, puisqu'elle joue un rôle important dans la spéciation des ETMs dans l'eau de mer (Gonzalez – Davila et al., 1995; Pawlik-Skowronska, 2001 ; Herzi et al., 2013a, b). Sunda et Hunstman (1998) ont rapporté que les exsudats produits par le phytoplancton, en se complexant avec les métaux, pourraient modifier la chimie des ETMs et contribuer ainsi à la détoxification métallique (Rauser, 1995 ; Morelli et Scarano, 2001;). C'est ainsi que la chlorophycée *Chlamydomonas reinhardtii* peut, en culture, excréter des phyto-chélateurs qui augmentent la complexation des métaux (Xue et al., 1988; Sunda et Guillard, 1976; Gouvêa et al., 2005).

Comme mentionné précédemment, la majeure partie des exsudats est composée de matière organique de haut poids moléculaire à l'instar des polysaccharides. Ces molécules sont exsudées d'une manière plus importante en cas de stress métallique (Pistocchi et al., 1997), et sont de différentes natures (Gonzalez-Davila, et al., 1995). Elles peuvent modifier la biodisponibilité des ETMs, et par conséquent leur toxicité (Vasconcelos et al., 2001). En effet, des microalgues exposées à différents métaux (tels que le cadmium, le cuivre, le mercure et le zinc) sont capables de produire des métallothionéines (Engel, 1987; Viarengo et

al., 1989), protéines riches en soufre et en cystéine, ayant un faible poids moléculaire (Fowler et al., 1987). Les métallothionéines ont la capacité de fixer des ions métalliques grâce à des interactions non covalentes (Cosson, 1992; Stillman, 1995), en utilisant des groupements thiols. Ces protéines ont alors un rôle de détoxification et de stockage des ETMs ainsi que de régulation du métabolisme des métaux essentiels, en réponse à des modifications physiologiques (Piscator et al., 1964).

Le phytoplancton utilise plusieurs stratégies de défense, soit directement à travers la synthèse de molécules intracellulaires ayant des capacités complexantes pour les métaux, ou indirectement, à travers l'exsudation dans l'espace extracellulaire de la MOD, en réponse au stress métallique (Nagata, 2000). Cette MOD, constituée principalement de carbohydrates et d'acides aminés, est susceptible de former des complexes avec les métaux. De plus, les acides aminés qu'elle contient possèdent une grande affinité de complexation vis-à-vis des ions métalliques libres (Biddanda et Benner, 1997). Plusieurs acides aminés peuvent agir comme des ligands via leurs groupes α – aminés et α – carboxylés. Dans les systèmes naturels, les constantes sont faibles par rapport aux cultures *in vivo*, en raison de la complexation des acides aminés avec d'autres cations présents dans le milieu (Lorenzo et al., 2007). Les acides aminés histidines et cystéines, exsudés par le phytoplancton, possèdent une grande affinité pour les cations métalliques libres, grâce à leurs groupes imidazoles et thiols (Buffle, 1988). Ainsi, ils sont considérés comme les acides aminés les plus complexants vis-à-vis des métaux (Farkas et Sóvágó, 2002). Les acides humiques et fulviques exsudés *in situ*, en réponse à une contamination métallique, possèdent également des pouvoirs complexants très élevés pour les métaux (Midorikawa et Tanoue, 1998).

-Les indicateurs cellulaires et biochimiques des effets toxiques du Cd :

Plusieurs paramètres ont été analysés pour étudier les effets toxiques du cadmium chez les cellules d'algues comme la division cellulaire, les réactions

photochimiques de la photosynthèse et la structure cellulaire. En présence de Cd, la diminution de la densité cellulaire ainsi que les changements de la taille ont été rapportés par quelques recherches. Il faut ajouter que l'augmentation de la taille cellulaire a été observée pour d'autres métaux comme le cuivre chez *Chlorella* sp, *S. capricornutum*, *P. tricornutum* (Stauber et Lim, 2001) .

-Les mécanismes de réponse au stress envers le Cd

En réponse au stress envers le Cd, les cellules végétales peuvent faire appel à plusieurs mécanismes de défenses, tels que l'exclusion, la synthèse des phytochélatines, la séquestration dans la vacuole, la synthèse des protéines de stress et les changements ultrastructuraux (Clemens, 2001 ; Gimmler et al., 1991 ; Hu et al , 2001 ; Nassiri et al. , 1997 ; Pal et Rai , 2010 ; Spijkennan et al., 2007 ; Visviki et Rachlin , 1994).

-Mécanismes de distribution cellulaire des métaux

Les espèces d'algues peuvent contrôler les concentrations internes des métaux essentiels par des mécanismes efficaces du contrôle homéostatique. Il a été observé que la détoxification cellulaire des métaux non essentiels contrôle l'absorption, la chélation, la distribution et la séquestration des métaux. En fait, après l'absorption par les transporteurs, les ions métalliques non essentiels sont liés par les chélateurs et les protéines de stress. Les agents chélatants fixent les métaux à l'état de complexes solubles et permettent leur élimination.

La détoxification et le stockage d'un métal non essentiel sont réalisés par leur séquestration dans la vacuole (Clemens, 2001).

La séquestration vacuolaire empêche la circulation des ions de Cd dans le cytosol (Hu et al,2001)

- Le rôle de la paroi et de la membrane cellulaire contre les effets toxiques des métaux :

La paroi et la membrane cellulaire peuvent jouer un rôle important pour la protection des cellules d'algues à l'action des effets toxiques des métaux. Les résultats obtenus par les études de Colard et Matagne (1990) ont montré que la paroi cellulaire indique une forte affinité pour la formation de complexes aux cations de Cd chez *C. reinhardtii* entraînant une résistance au Cd par rapport à la souche sans paroi cellulaire (Collard et Matagne, 1990).

- La synthèse des phytochélatines et la détoxification des ions métalliques .

Les phytochélatines (PC,) ont été isolées et purifiées pour la première fois par Grill et ses collègues (1985). La phytochélatine est composée de trois acides aminés, la glutamine (Glu), la cystéine (Cys) et la glycine (Gly) . Les phytochélatines forment une famille de structures avec la répétition des unités dipeptides de Glu-Cys et terminé par Gly. (Grill, Winnacker et Zenk, 1985 ; Rauser, 1995). La Figure montre la structure chimique de la phytochélatine (Pal et Rai , 2010).

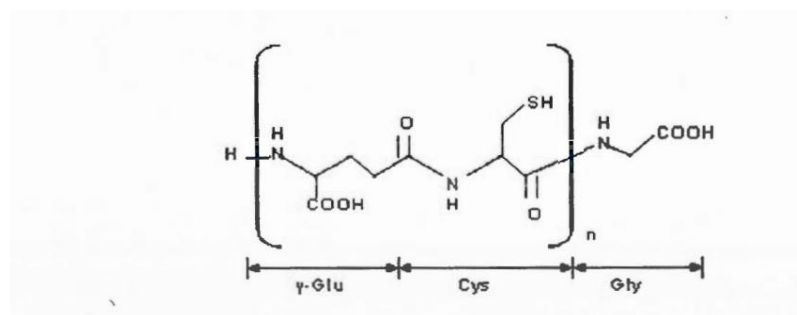


Figure. 18: Structure chimique de phytochelatine.

Il a été rapporté que les phytochélatines sont apparues lors de l'induction des cellules végétales par les métaux lourds tels que le cadmium, le zinc, le cuivre, le plomb et le mercure et elles ont été impliquées dans la détoxification et le métabolisme des ions métalliques . En raison de la présence des groupements thiols des cystéines, les phytochélatines sont capables de former quelques complexes avec le Cd qui empêche la circulation des ions libres du Cd dans le cytosol (Grill , Winnacker et Zenk, 1985).

Les changements ultrastructuraux dus aux effets toxiques des métaux :

Les vacuolisations cytoplasmiques, le développement des organites membraneux, L'accumulation des lipides, l'accumulation de l'amidon et l'accumulation cytoplasmique de granules en réponse à l'action toxique des métaux chez les algues et les protozoaires ont été rapportés, Nassiri et ses collègues (1997) ont montré une vacuolisation du cytoplasme et du chloroplaste chez la diatomée marine *Skeleton emacostatum* exposée aux différentes concentrations de Cd et de Cu. Le Cd et le Cu ont été séquestrés seulement dans les inclusions vacuolaires sphériques. Après le traitement avec le Cd, le volume de l'inclusion sphérique a été augmenté. Ces inclusions vacuolaires denses ont été enrichies en soufre et azote et les auteurs ont suggéré que le Cd s'est lié probablement aux molécules organiques par les liaisons S-Cd réduisant les concentrations de Cd du cytosol.

L'apparition des granules forment des complexes aux cations métalliques et participent aux mécanismes de détoxification des métaux.

MATERIELS ET METHODES

1/Matériel biologique.....	50
2/Culture de Nannochloropsis gaditana.....	50
2/a- Composition du milieu de culture F2 Guillard.....	51
2/b- Suivi de la croissance des microalgues.....	52
3/ Extraction des métabolites pariétaux	52
3/a- Obtention du résidu pariétal.....	52
3/b -Extraction de la cellulose.....	53
3/c -Extraction de l'holocellulose	53
3/d - Extraction de l'hémicellulose	53
4/ Caractérisation physicochimique des polymères pariétaux :.....	54
4/a- Analyse par spectroscopie infrarouge à transformé de fourier (IRTF).....	54
4/b- Analyse de la cellulose par diffractométrie de rayons X (DRX)...	54
4/c- Analyse par RMN Solide.....	55
4/d- Analyse thermogravimétrique.....	55
4/e- Analyse par Calorimètre différentielle à balayage.....	55
5/ Production de nanoparticules de cellulose	56
6/ Dosage des métaux lourds par SAA	56

1/Matériel biologique:

Nannochloropsis gaditana est produite en masse dans des photobioreacteurs plats (Fig.19) par la société « partisano Biotech Algérie » établie à Sidi Belabess à l'ouest algérien.

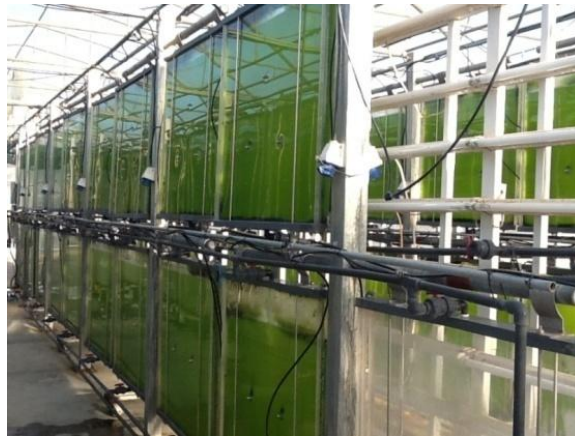


Figure. 19 : photo de l'installation des photobioreacteurs plats de la société Partisano Biotech Algérie.

Les échantillons sont fournis sous forme de poudre sèche pour l'extraction des différents métabolites, ou vivants en solution pour repiquage et culture au laboratoire.

2/ Culture de *Nannochloropsis gaditana*.

Les solutions microalgales reçues sont d'abord filtrées sur de la gaze pour éliminer le zooplancton. Les cultures stock d'environ 1.10^5 cellules /ml sont repiquées tous les 15 jours pour les maintenir jeunes et contrôlées au microscope optique pour observer l'état de pureté. La culture est réalisée dans des erlenmeyer de 250ml dans le milieu F2 Guillard (Guillard and Ryther 1963) pH8 à température 23-25°C et sous intensité lumineuse de $180 \mu\text{mol}$ de photons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-2}$ en continu. Les milieux sont agités manuellement 2 fois par jour afin de maintenir les microalgues en suspension.

Pour l'étude de la croissance, des repiquages en triplicata sont réalisés. Ainsi 10 ml de solution mère d'une culture en début d'une phase exponentielle ($DO_{\lambda 500nm}=0.045$) sont ajoutées à 250 ml de milieu Guillard et ce en présence ou en absence de métaux lourds.

Les métaux lourds utilisés sont : $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ et $CdNa_2O_6 \cdot 4HO_2$

2/a Composition du milieu de culture F2 Guillard :

Ajouter à 950 mL d'eau de mer naturelle filtrée sur 1 μm :

Volume	Composé	Concentration de la solution stock (stérile)	Concentration finale dans le milieu
1.0 mL	$NaNO_3$	75 g/L	$8.83 \cdot 10^{-4}$ M
1.0 mL	NaH_2PO_4 , H_2O	5 g/l	$3.63 \cdot 10^{-5}$ M
1.0 mL	Na_2SiO_3 , $9H_2O$	30 g/L	$1.07 \cdot 10^{-4}$ M
1.0 mL	f/2 trace metal solution	Cf ci-dessous	–

Compléter à 1 L avec de l'eau de mer naturelle filtrée sur 1 μm et autoclaver 30 min à 121 °C. Après refroidissement à température ambiante, ajouter en condition stérile 1mL de solution vitaminée (voir composition). Passer le milieu sur membrane filtrante type (0.2 μm). La solution est conservée à +4°C.

f/2 trace metal solution

Ajouter à 950 ml d'eau MilliQ :

Volume ou poids	Composé	Concentration de la solution stock (stérile)	Concentration finale dans le milieu
3.15 g	$FeCl_3$, $6H_2O$	–	$1 \cdot 10^{-5}$ M
4.36 g	Na_2EDTA , $2H_2O$	–	$1 \cdot 10^{-5}$ M
1.0 mL	$CuSO_4$, $5H_2O$	9.8 g/L	$4 \cdot 10^{-8}$ M
1.0 mL	Na_2MoO_4 , $2H_2O$	6.3 g/L	$3 \cdot 10^{-8}$ M
1.0 mL	$ZnSO_4$, $7H_2O$	22.0 g/L	$8 \cdot 10^{-8}$ M
1.0 mL	$CoCl_2$, $6H_2O$	10.0 g/L	$5 \cdot 10^{-8}$ M
1.0 mL	$MnCl_2$, $4H_2O$	180.0 g/L	$9 \cdot 10^{-7}$ M

Compléter à 1l avec de l'eau stérile filtrée sur 0.2 μm . la solution est stockée à -20°C.

f/2 solution vitaminée :

0.1ml de vitamine B₁₂ à 1mg/ml

1ml de Biotine à 0.1mg/ml

Thiamine HCl 20mg

H₂O distillée qsp 100 ml

2/b- Suivi de la croissance des microalgues.

Deux méthodes sont utilisées pour le suivi de la croissance, l'absorbance et densité cellulaire.

La croissance de *Nannochloropsis gaditana* peut être suivie par l'absorbance. Cependant des valeurs différentes de longueur d'onde sont utilisées d'un travail à un autre, 600nm (Yongxue Chi et al, 2015) et 540nm (Jorge M.S et al, 2003) pour ne citer que cela. De ce fait nous avons élaboré un spectre d'absorption d'une culture de *N.gaditana*. Le maximum d'absorption est observé à 500nm nous avons adopté cette longueur d'onde pour le suivi de la croissance.

La densité cellulaire est suivie sur cellules de Malassez.

Toutes les mesures sont réalisées en triplicata.

3/ Extraction des métabolites pariétaux

La cellulose et l'hémicellulose sont les deux principaux polymères qui constituent la paroi des microalgues. Ces deux polymères sont intimement liés et constituent l'holocellulose. La cellulose est extraite directement après obtention du résidu pariétal alors que l'hémicellulose serait extraite à partir d'holocellulose.

3/a -Obtention du résidu pariétal

5 g de poudre sèche de microalgues sont traités par 100 ml d'un mélange toluène / éthanol (68:32) (v / v) pendant 24 heures sous agitation magnétique à température ambiante. La masse obtenue après filtration sur papier Wathman représente le résidu pariétal qui sera soit séché à l'étuve pour conservation ou directement utilisé pour l'extraction des polymères constitutifs.

3/b -Extraction de la cellulose

La méthode d'extraction de la cellulose utilisée est une modification de la méthode de Jayme-Wise (Leavitt et al. 1993; Gaudinski et al. 2005; Rosli et al. 2013).

Le résidu pariétal est traité à 200ml de NaOH (2% ou 4%) pendant 2 heures à 80 ° C, pour éliminer l'hémicellulose. Après centrifugation le culot est traité pour blanchiment par 200 ml à l'hypochlorite de sodium (6% ou 10%) à pH 4,8 sous agitation pendant 2 heures à 70 ° C. Le culot de cellulose récupéré par centrifugation à 5000 rpm pendant 10mn est séché par lyophilisation et pesé.

3/c -Extraction de l'holocellulose :

Le résidu pariétal obtenu à partir de 5g de N.gaditana est blanchi par 200ml à l'hypochlorite de sodium (NaClO₂) 10%, pH4.8 à 75°C pendant 2H sous agitation. Après centrifugation à 5000 rpm pendant 5mn, le culot est récupéré. L'opération de blanchiment est répétée une seconde fois. Le résidu final obtenu après lavage à l'eau distillée suivi d'une centrifugation est composé essentiellement de cellulose et d'hémicellulose formant ainsi l'holocellulose. Ce polymère est conservé par lyophilisation.

3/d -Extraction de l'hemicellulose :

Les hémicelluloses sont extraites à partir d'holocellulose par traitement au NaOH 2% à 80°C pendant 2H. La solution de soude est préalablement additionnée de Borohydrure de sodium (NaBH₄), un agent réducteur qui protège l'hémicellulose de la dégradation. Le surnageant obtenue après centrifugation est neutralisé à l'acide acétique glacial diluée au 1/10. Une précipitation à l'éthanol absolu (3 V) est effectuée. L'hémicellulose est précipitée par centrifugation à 5000 rpm pendant 5min puis conservée par lyophilisation pour analyse. (BARBAT A, 2009) .

4-Caractérisation physicochimique des polymères pariétaux

Les produits ,cellulose, hémicellulose et holocellulose obtenus a partir des différents procédés d'extraction sont soumis à différentes analyses spectrales et thermiques .Carboxymethyl cellulose , linters de coton ainsi que la lignine sont des produits commerciaux utilisés comme référence. Ces analyses ont été réalisés essentiellement au niveau des laboratoire de chimie des polymères de l'université d'Oran 1 dirigé par le professeur M.Belbachir , ainsi que du laboratoire du département de pharmacie du King collège de Londre, dirigé par le professeur J. Stuart.

4/a- Analyse par spectroscopie infrarouge à transformé de fourier (IRTF).

Les spectres FTIR des 3 polymères ont été mesurés sur spectrophotomètre infrarouge FT-IR alpha Brucker . La résolution utilisée est de 26 scan. Le balayage a été pris avec une plage de fréquences de $4000-400\text{ cm}^{-1}$, en utilisant le mode de transmission.

4/b- Analyse de la cellulose par diffractométrie de rayons X (DRX) :

La cristallographie aux rayons X ou diffractométrie de rayons X (DRX), est basée sur la [diffraction](#) des [rayons X](#) sur la matière. La diffraction n'a lieu que sur la matière [cristalline](#). Des échantillons de cellulose sont analysés de 4 à 70° pour un angle (2θ) avec un pas de $0,02^\circ$ et un temps d'acquisition de 1s, par un R-X diffractomètre (DRX D8 Advance Brucker) du laboratoire de chimie des polymères de l'université Oran1.

4/c- Analyse par RMN Solide

Le spectre de Résonance magnétique nucléaire du CP / MAS ^{13}C -RMN a été enregistré pour des échantillons solides de cellulose, hémicelluloses, et holocellulose , extraits de N.gaditana ainsi que de la lignine commerciale et cellulose de linter de coton, sur un appareil Bruker BioSpin GmbH , à la

température ambiante. Le taux MAS de 400 Hz avec un temps de 5 μ s avec un retard de 2 secondes de contact est utilisé. L'appareil est calibré avec de l'adamantin, à un signal ^{13}C haute fréquence à 38.4ppm.

4/d- Analyse thermogravimétrique

C'est une technique d'[analyse thermique](#) qui consiste en la mesure de la variation de [masse](#) d'un échantillon en fonction du temps, pour une [température](#) ou un profil de température donné.

L'échantillon est équilibré à 25°C, et un pas de 10°C est appliqué à 450°C en utilisant Universal TA instrument V4.5A. Toute l'analyse est effectuée sous azote gazeux à un débit de 10 ml / min.

4/e- Analyse par Calorimètre différentielle à balayage

La calorimétrie différentielle à balayage est une technique d'[analyse thermique](#). Elle mesure les différences des échanges de chaleur entre un échantillon à analyser et une référence. Elle nous permettrait de déterminer les [transitions de phase](#) notamment les températures de [fusion](#) et de [cristallisation](#) dont pourrait faire l'objet la cellulose et autres polymères étudiés.

Les analyses sont réalisées sous balayage d'un gaz inerte, l'[azote](#), à un débit de 10ml/min, pour éviter toute réaction de l'échantillon avec l'atmosphère du four.

L'analyse est menée sur un appareil DSC 2920. L'échantillon est équilibré à 25°C puis un pas de 10°C est appliqué à 200°C.

5-Production de nanoparticules de cellulose:

Nanoprécipitation, également connu sous le déplacement de solvant, ou le dépôt interfaciale est utilisée pour produire les nanoparticules. Ce procédé implique la dispersion d'un matériau organique dans une phase aqueuse. La phase aqueuse est composée de tampon citrate (pH = 4,8) et 0,5% p / v de poloxamer 188. La

phase organique contenait 15 ml de solvant organique dans lequel 15 mg de cellulose et 75 mg de phospholipides sont dissous. Le procédé a été répété deux fois avec deux solvants organiques différents, du méthanol pur et l'acétone. La phase aqueuse (30 ml) a été homogénéisée (Silverson L4RT, NOVATECH UK Ltd.) pendant 2 minutes à 5000rpm. Pendant le processus d'homogénéisation en continue, on a ajouté la phase organique (15 ml) goutte à goutte à une vitesse de 8 mm / min par une pompe de seringue (Razel Scientific Instrument, VT, USA). Une fois la phase organique est dispersée dans la phase aqueuse, la suspension est homogénéisée pendant 10 min et laissée pendant 24 heures sous agitation magnétique douce à température ambiante pour permettre la l'évaporation complète du solvant organique. La solution est centrifugée à 4000rpm (Heraeus Megafuge 1.0R, DJB Labcare Ltd. UK) pendant 10 minutes à température ambiante afin d'éliminer les grosses particules. Les suspensions avec ou non la cellulose ont été préparées suivant le même procédé de fabrication afin de vérifier l'effet de la présence de cellulose dans les nanoparticules, une fois que les nanosuspensions ont été préparés, les nanostructures sont observées en microscope à force atomique.

-6/Dosage des métaux lourds par spectrométrie d'absorption atomique.

Le dosage est effectué sur un spectromètre de marque Analytic Jena novAA 400P avec lampe à cathode creuse spécifique à chaque métal.

Des courbes étalons sont d'abords réalisées pour chaque métal à partir de solutions standards commerciales fournis avec l'appareil.

Les solutions témoins pour les courbes étalons sont préparées comme suit :

Dans des fioles jaugées de 100 ml, un volume de 1ml de KCl à 0.1% plus 15ml d'acide nitrique à 1% est additionné à un volume d'étalon à concentration désirée .Le mélange est ajusté à l'eau distillée jusqu' 100 ml.

Nous avons étudié trois ions : le fer le cuivre et le cadmium.

Pour le dosage du fer et du cuivre on a utilisé une gamme étalon de 1 à5ppm

N.gaditana est mise en culture en présence de cuivre ou de fer à différentes concentrations.

Au bout du 15^{ème} jours (phase stationnaire) le milieu de culture a été centrifugé. Le surnagent obtenu est directement dosé par aspiration automatique dans l'appareil.

Pour le dosage du cadmium on a utilisé une gamme étalon de 2 à 10ppm.

Une cinétique de croissance de *N.gaditana* est établie en présence de cadmium (10ppm à 500ppm), un suivi du dosage résiduel de cadmium est établi par SAA à partir du surnageant.

RÉSULTATS ET DISCUSSION.....60

1/ Caractérisation de la cellulose de <i>Nannochloropsis gaditana</i>	62
1/a - Analyse de la cellulose par FT-IR.....	62
1/ b-Analyse de la cellulose de <i>N.gaditana</i> par XRD.....	68
2/ Caractérisation de l'hemicellulose de <i>Nannochloropsis gaditana</i> par FT-IR	69
3/ Caractérisation de l'holocellulose par FT-IR.....	72
4/ Analyse des composés pariétaux de <i>Nannochloropsis gaditana</i> par RMN solide.	74
5/ Analyse thermogravimétrique des composés pariétaux de <i>Nannochloropsis gaditana</i>	78
6/ Analyse calorimétrie différentielle à balayage	80
7/ Étude des nanoparticules cellulosiques	80
8/ Effet des métaux lourds sur la croissance de <i>Nannochloropsis gaditana</i>	81
8/a-Effet du cadmium sur <i>Nannochloropsis gaditana</i>	81
8/b-Effet du fer et du cuivre sur la croissance de <i>Nannochloropsis gaditana</i> ...	88

La cellulose est un polymère de glucose en conformation chaise 4C_1 dont la macromoléculaire varie entre 50 kDa et $2,5 \cdot 10^6$ Da soit de 300 à 15000 résidus glucose.

Chez les cellules végétales jeunes, ce polymère d'apparence simple, se trouve complexé sous forme de microfibrilles avec d'autres polysaccharides (hémicellulose, pectines) et autres protéines membranaires constituant ainsi la paroi primaire (Fig.20). Après la croissance complète de la cellule végétale, une paroi secondaire se forme entre la paroi primaire et la membrane plasmique, constituée outre de la cellulose et l'hémicellulose d'un complexe réticulé d'unités phénoliques, la lignine, intimement liée et enchevêtrée aux deux polymères. Ceci explique la complexité de l'extraction de la cellulose. Chez les végétaux supérieurs la cellulose représenterait 45% de la paroi.

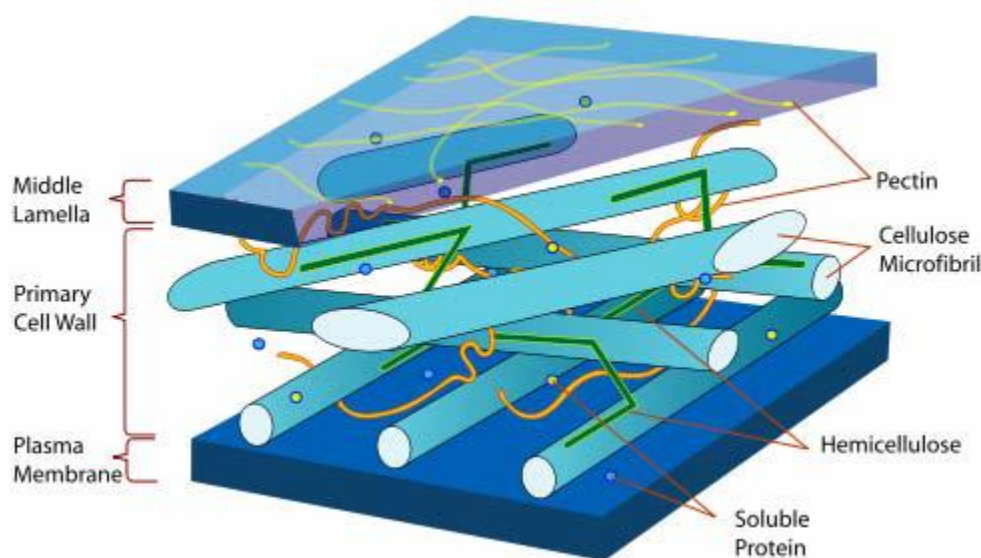


Figure .20 : structure de la paroi primaire (Jean-Luc WERTZ, ValBiom 6èmes Rencontres de la Biomass Gembloux – 21 octobre 2009)

La paroi cellulaire de *Nannochloropsis gaditana* (Fig.21) observée au microscope électronique à balayage montre une structure en bicouche constituée d'une paroi intérieure cellulosique protégée par une couche d'algaenane hydrophobe externe (Scholz et al., 2014). La présence de ce polymère confère une certaine résistance à *N.gaditana* aux lyses enzymatiques d'origine bactérienne ou lors du passage dans le tractus digestif des prédateurs. Elle les préserve également des conditions environnementales potentiellement délétères.

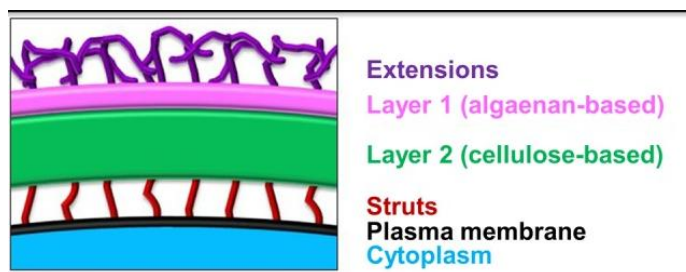


Figure.21 : Structure de la paroi cellulaire de *Nannochloropsis gaditana* (Scholz et al., 2014)

Chez les microalgues en général nous n'avons aucunement rencontré de travaux sur la quantification de la cellulose. Un dosage gravimétrique préliminaire nous a permis d'estimer ce polymère chez *N.gaditana* à 25% du poids sec cellulaire et l'hémicellulose à 1.5%. Nous n'avons pas trouvé de traces de lignines par les méthodes colorimétriques et observation au microscope photonique. Cette coloration consiste, en général, en une coloration de la cellulose et de la lignine par le "carmin vert d'iode" : la cellulose est alors colorée en rouge et la lignine en vert. Cependant nous avons réalisé des travaux plus élaborés sur RMN solide pour confirmer cette observation.



1/a - Analyse de la cellulose par FT-IR

Les spectres infrarouges de la cellulose végétale ont été étudiés dans la littérature, et les pics des différents groupements fonctionnels ont été identifiés. (Nelson et O'Connor, 1964; Oh et al., 2005; Alvarez et Vazquez, 2006;.. Yang et al, 2007). Nous avons donc utilisé cette base de données en vue de la caractérisation par FT-IR de la cellulose extraite à partir de *N.gaditana* à défaut de travaux dans ce sens sur les microalgues.

L'analyse par FTIR de la cellulose microalgale extraite par du NaOH à 2% et 6% d'hypochlorite de sodium (NaClO_2) (Fig.22) est effectuée pour identifier le polysaccharide et déterminer ses contaminants tels que: les hémicelluloses, les lipides et les protéines.

Le spectre obtenu (Fig.22) révèle une large bande dans $3600\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$ correspondant à la fonction (-OH).

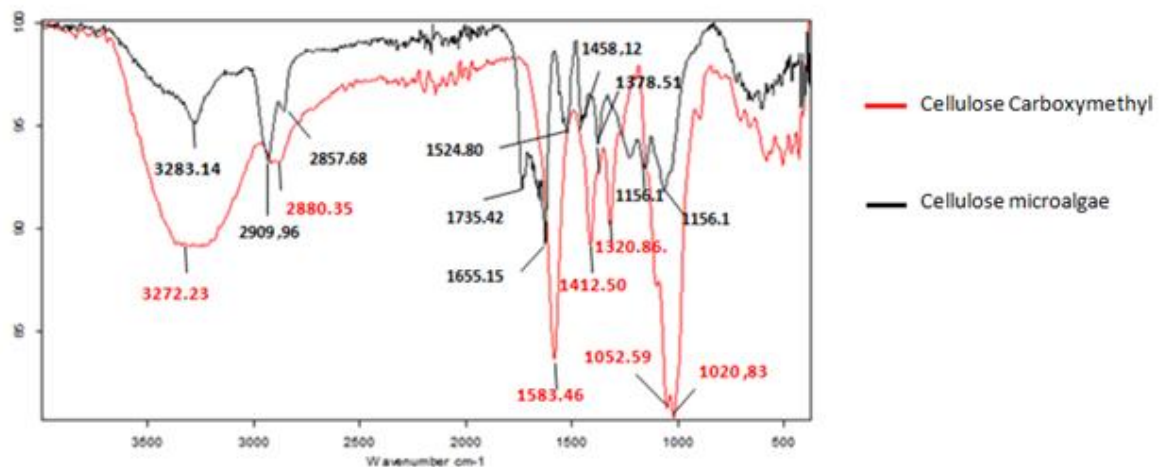


Figure.22 : spectre infrarouge de cellulose de *N.gaditana* extraite à 2%NaOH suivi de 6% NaClO_2 et de CM cellulose.

Le pic à 3283 cm^{-1} et 3272 cm^{-1} correspondent à la présence des groupements hydroxyles de la cellulose algale et de la carboxyméthylcellulose, respectivement.

Les pics 2929 cm^{-1} / 2857 cm^{-1} et 2880 cm^{-1} correspondent aux vibrations

d'élongation du groupement (C-H) de la cellulose algale et du carboxyméthyl cellulose (Oh et al, 2005; Nelson et O'Connor, 1964.). Le pic présent à 1069 cm^{-1} correspondant à $950\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ est attribué à la vibration du groupement C-O du carbone C₂. La bande 1632 cm^{-1} correspond au groupe carbonyle. En outre, les bandes d'absorption FTIR à $1458\text{ cm}^{-1}/1378\text{ cm}^{-1}$ et $1412/1320\text{ cm}^{-1}$ sont attribuées aux vibrations de déformation du groupement O-H. La présence du pic à 1156 cm^{-1} situé entre $1170\text{-}1082\text{ cm}^{-1}$ correspond aux vibrations d'élongation antisymétrique de la liaison glycosidique C-O-C. L'apparition du pic 1524 cm^{-1} à l'intervalle ($1600\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$) correspond aux cycles aromatiques. Ce groupement apparaît en raison de la présence de peptides ou protéines. Les protéines représentent environ 1% du contenu pariétale de *N.gaditana* (Scholz, 2014). Le pic présent à 1735 cm^{-1} dans le spectre de la cellulose obtenue à partir de NaOH à 2% et 6% NaClO₂ pourrait être dû à la présence d'hémicelluloses, qui contiennent des liaisons C = O à l'intervalle $1765\text{-}1715\text{ cm}^{-1}$. Une autre possibilité est due au groupement carboxyle ou aldéhyde (de 1736 cm^{-1}) située dans l'extrémité réductrice de la cellulose (Juan., 2008). Le groupement carboxyle peut être dû à la présence de lipides. En effet des contaminants lipidiques pourraient exister du fait de la présence d'une couche d'algaenan protégeant la paroi de *N.gaditana*. La paroi cellulosique de *N.gaditana* est protégée par une couche d'algaenane qui est une structure lipidique (Scholz, 2014).

En vue de vérifier de la présence ou pas de l'hémicellulose dans l'extrait cellulosique, nous avons dans une deuxième étape d'extraction augmentée la concentration en NaOH de 2% à 4% suivie d'un blanchiment à l'hypochlorite de 6%. Le NaOH permet la solubilisation de l'hémicellulose.

Cette augmentation de NaOH ne diminue pas l'intensité du pic 1735 cm^{-1} mais au contraire elle l'augmente (Fig.23). Le pic 1735 correspond aussi aux groupement aldéhyde et carboxyle (Juan 2008). L'augmentation de la

concentration en NaOH aurait hydrolysé des liaisons hydrogènes intramoléculaire de la cellulose rendant la structure cristalline plus amorphe, permettant ainsi une meilleure accessibilité des groupement fonctionnels au spectre infrarouge d'où l'augmentation de l'intensité du pic 1735. D'ailleurs cette augmentation d'intensité est observée pour l'essentiel des groupes fonctionnels de la cellulose microalgale notamment les groupements hydroxyyles (pic3283) et les liaisons glycosidiques (pic1156cm⁻¹).

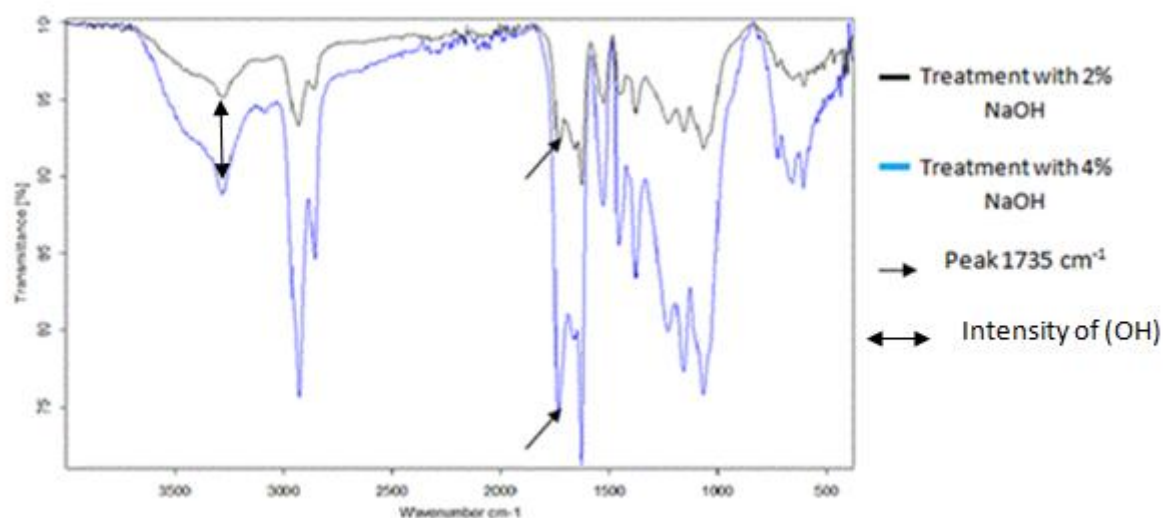


Figure.23. : Spectre FT-IR de la cellulose extraite à partir de N.gaditana à 2%, 4% de NaOH suivi de 6% de NaClO2

La structure cristalline de la cellulose est assurées par des liaisons hydrogènes intra et inter moléculaires (Fig.24)

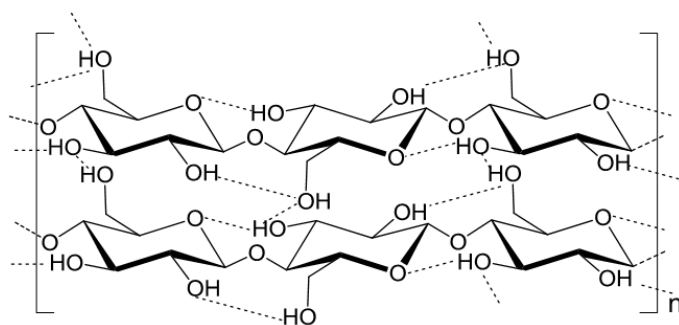


Figure.24: Liaisons hydrogène intra et intermoléculaires dans la cellulose
(Barbat A,2009)

Les liaisons hydrogènes intramoléculaires se forment entre les groupements hydroxyles des positions C3 d'une unité de glucose et ceux de l'oxygène O5 d'une unité adjacente de glucose dans la chaîne (fig10a), ainsi que les liaisons hydrogène situées entre les groupements hydroxyles des atomes de carbone en position C6 et C2 d'unités de base avoisinantes (Fig.25)



Figure.25 : réseaux de liaisons hydrogènes intramoléculaires selon a) Liang et Marchessault 1959 et b) Balackwell et al 1977

Un deuxième réseau de liaisons d'hydrogènes intermoléculaires formées entre les groupements OH aux positions C6 et C3' de la molécule de cellulose localisée de manière adjacente dans le même plan (Klemm et al.1988) (Fig.26) constitue la zone cristalline de la cellulose.

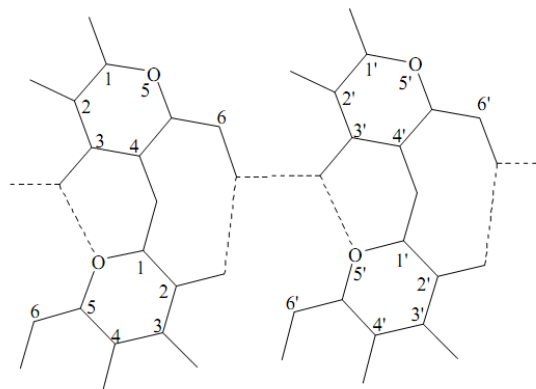


Figure.26 : liaison hydrogène intermoléculaire

Selon ces figures nous observons que les -OH sont impliqués dans la structure cristalline et que les liaisons glycosidiques seraient à l'intérieur de cette structure. Le NaOH agirait en hydrolysant les liaisons hydrogène libérant ainsi les -OH et rendant les liaisons glycosidiques plus accessibles. Ces groupements sont donc accessibles à l'infrarouge d'où une augmentation d'intensité avec l'augmentation de la concentration en NaOH lors de l'extraction.

Selon le concept de Fink et ses collaborateurs (1995), la rupture des liaisons hydrogènes intra et inter moléculaire est provoqué par des paires d'ions Na^+ et OH^- hydratés, entraînant une inversion de la liaison glycosidique entre C1 et C4 de deux motifs anhydroglucose. Ces auteurs pensent qu'à concentration inférieure à 18% en NaOH

Seule la liaison hydrogène intramoléculaire entre C2 –C6 (voir fig.25) est rompue et que la liaison impliquant le C3 n'est atteinte qu'à concentration supérieure à 22% de soude.

Le carbone C3 serait le plus résistant à la complexation à la soude (Iso 1997).

L'augmentation de la concentration en NaOH affecte la structure de la cellulose extraite de *N.gaditana* mais ne semble pas affecter le contenu de l'extrait. Les profils spectraux restent inchangés.

De ce fait nous avons maintenu la concentration de NaOH stable à 2% et faisons varier la concentration du NaClO_2 de 6% à 10% pour le blanchiment.

L'augmentation de la concentration de NaClO_2 6% à 10% (Fig.27) met en évidence encore plus les groupes fonctionnels de la cellulose, exprimée par l'augmentation de l'intensité des pics. Les concentrations à 10% NaClO_2 agiraient sur la structure de la cellulose en rendant ses fonctions plus accessibles

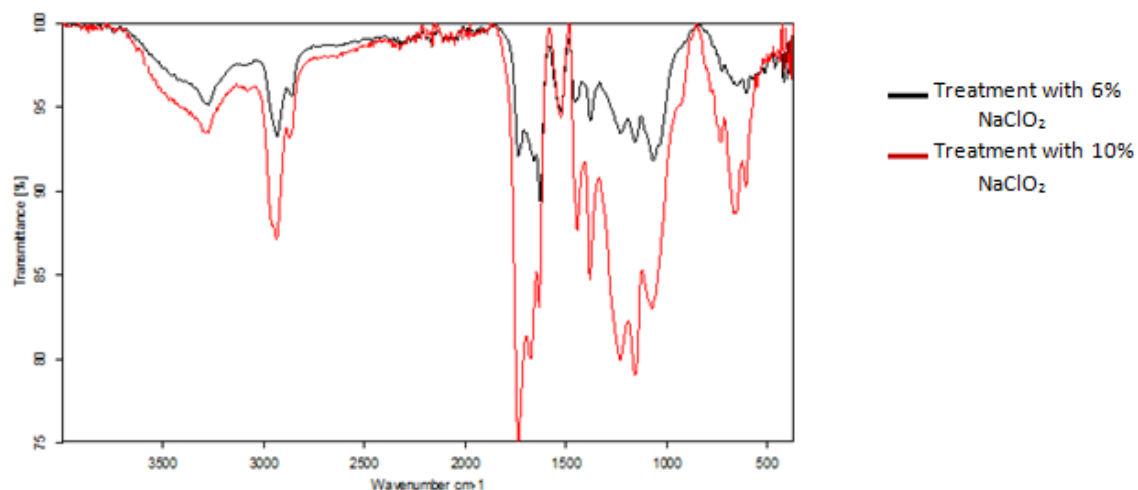


Figure .27 : FT-IR de la cellulose extraite à partir de *N.gaditana* à 2% de NaOH suivi de 6% , 10% de NaClO₂

L'effet de l'augmentation de la concentration de l'hypochlorite est similaire à l'effet de l'augmentation de la concentration du NaOH, sur la structure de la cellulose.

Dans les deux cas la cellulose deviendrait plus amorphe. L'analyse par diffractométrie de rayons X permettrait de confirmer cette hypothèse.

1/ b-Analyse de la cellulose de *N.gaditana* par XRD

Afin d'identifier les zones cristallines et amorphes de celluloses obtenues dans ce travail, la diffractométrie aux rayons X a été réalisée. Des échantillons de cellulose obtenues à différentes concentrations de NaOH (2% ou 4%), suivie par un blanchiment à l'hypochlorite de sodium à 6% et une autre obtenue après le traitement avec NaOH à 2% ou 4%, suivie à l'hypochlorite de sodium à 10% ont été analysés.

La diffraction des rayons X confirme l'hypothèse selon laquelle la variation de la concentration en NaOH de 2% à 4% implique une structure amorphe de la cellulose et cette structure amorphe devient de plus en plus abondante à une concentration maximale de l'hypochlorite de sodium à 10% (Fig.28).

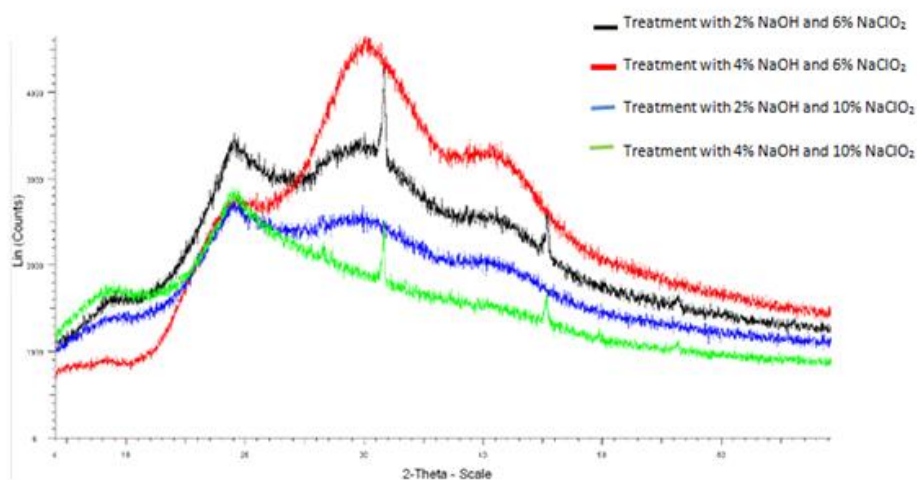


Figure 28 : Diffractogramme de la cellulose extraite à partir de 2%,4% de NaOH suivie de 6% ,10% de NaClO₂

La cellulose à l'état natif, est un matériau semi-cristallin dans lequel on distingue des zones faiblement organisées (dites amorphes) et des zones très organisées (dites cristallines) (Roy C, 2002) (Fig.29).

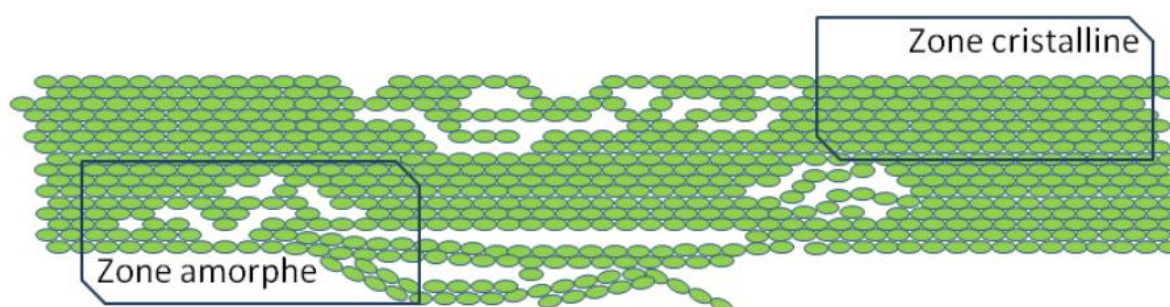


Figure.29 : Schéma de l'aspect semi cristallin de la cellulose (Claisse N, 2012)

Cependant l'augmentation de la concentration de NaOH à 4% (1ère étape d'extraction) ou l'hypochlorite à 10% (2ème étape d'extraction) affecte la structure semicristalline de la cellulose en la rendant de plus en plus amorphe.

Cette augmentation de concentration d'extractants semble donc affecter les liaisons hydrogènes qui sont des liaisons faibles, impliquant un changement de conformation structural mais ne toucherait pas la présence de contaminants potentiels tels que les lipides pariétaux, protéines mais surtout l'hémicellulose

qui est le polymère intimement lié à la cellulose. Ou du moins si action existe elle ne serait pas détectable vue la faible quantité de contaminants. A cet effet, nous nous sommes proposé d'extraire principalement l'hémicellulose de *N.gaditana* et de la caractériser par infrarouge. Cette substance que nous avons dosée gravimétriquement représente 1.5% du poids sec de *N.gaditana*.

2/ Caractérisation de l'hémicellulose de *Nannochloropsis gaditana* par FT-IR

La figure 30 représente le spectre d'absorption de l'hémicellulose extraite à partir de *Nannochloropsis gaditana*. Ce spectre a été commenté par rapport aux travaux réalisés sur l'hémicellulose de végétaux supérieurs. Les travaux dans ce sens sur les microalgues étant inexistant.

La présence de la bande 3283 cm^{-1} similaire à celle observée pour la cellulose et la bande 2927 cm^{-1} sont signalées comme représentant les vibrations d'élongation des groupements hydroxyles (-OH) respectivement par Peng et al. (2012) et Sun et al. (2012). L'hémicellulose est constituée de sucres et de contaminants cellulose. Le pic 1622 cm^{-1} correspond aux groupements carbonyle de l'hémicellulose. La bande 1563 cm^{-1} représenterait des vibrations des cycles aromatiques. En effet il est indiqué dans la littérature que l'intervalle ($1600\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$) correspond aux cycles aromatiques. Ce groupement apparaît en raison de la présence de peptides ou protéines. Les protéines représentent environ 1% du contenu pariétale de *N.gaditana* (Scholz, 2014) et resteraient donc fortement associés à l'hémicellulose après son extraction. Les bandes 1405 et 1257 cm^{-1} correspondent aux vibrations de déformation dans le plan des groupements C-H et O-H ou C-O (Peng et al., 2012). La région entre 100 à 800 cm^{-1} représente les vibrations d'élongation des groupements C-O et donne l'information sur le type de polysaccharides présents (Kacurakova et al, 1994 ; Hromadkova et Ebringerova, 2008 ; Peng et al ,2012 ; Sun et al, 2012). La bande 1036 cm^{-1} située entre $1152\text{-}995\text{ cm}^{-1}$ avec une forte intensité, est spécifique pour à arabinosylane (Kacurakova et al, 1998 ; Sun et al,

2012). Cette bande indique le type d'hémicellulose présent dans la paroi de *Nannochloropsis gaditana*. L'hémicellulose de *N.gaditana* est de type arabinoxylane.

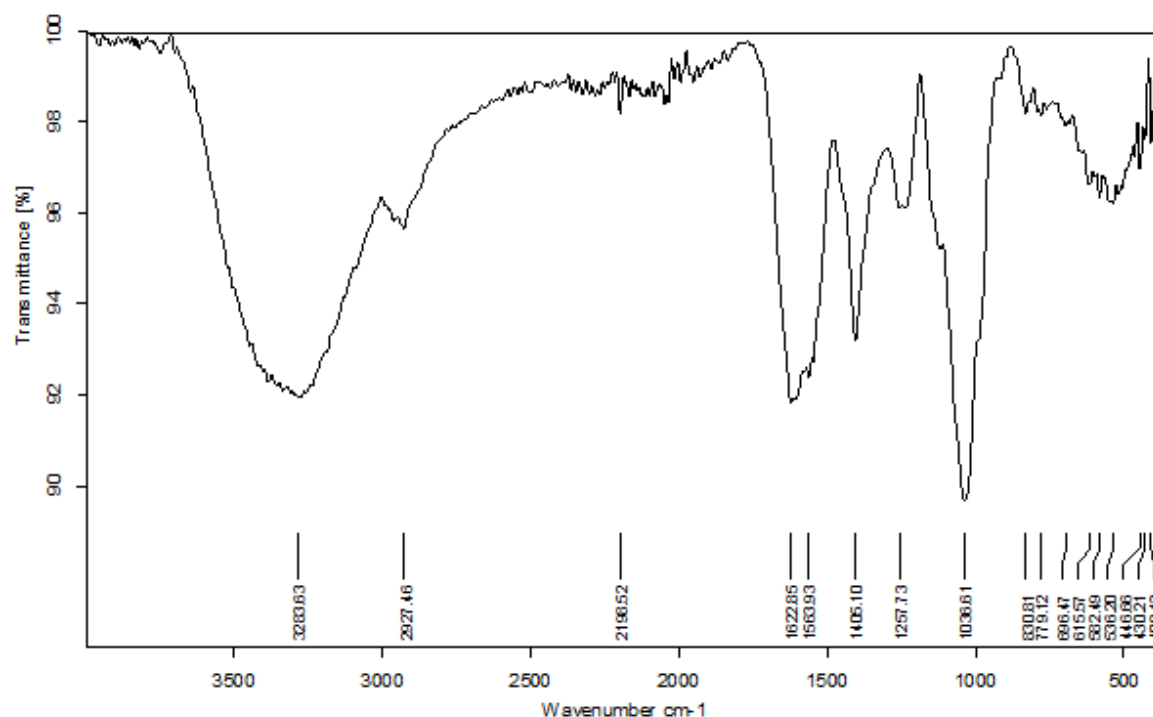


Figure. 30 : spectre d'absorption FTIR de l'hémicellulose extraite de *Nannochloropsis gaditana*.

Peu ou pas de travaux existent sur l'hémicellulose de microalgues. Ils ont été identifiés chez les végétaux supérieurs comme étant des polymères de pentoses ou d'hexoses mixtes de saccharides neutres xylose, arabinose, mannose, galactose, glucose (Fig.31) et de saccharides acides essentiellement l'acide glucuronique ou de méthylglucuronate, essentiellement en C4.

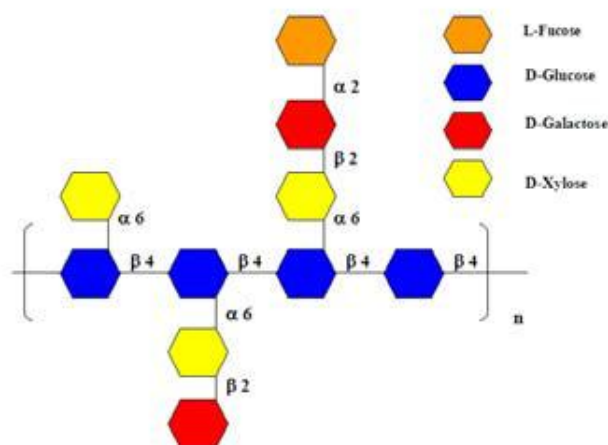


Figure 31 : représentation schématique de l'hémicellulose associée à la cellulose

Ces hémicelluloses sont dispersées dans le réseau de cellulose amorphe. Elles représentent 15 à 40% chez les végétaux supérieurs. *Nannochloropsis gaditana* n'en contiendrait que 1.5% de son poids sec. Les structures sont amorphes (ramifiées), elles peuvent avoir un rôle structural et de réserve pour le végétal.

La chaîne principale de ces polymères est généralement constituée par un seul monosaccharide sur lequel vient se greffer d'autres saccharides. Ainsi on rencontre les xylanes qui sont constitués par un squelette de β D xylose liés en 1,4. On compte de 50 à 200 résidus de xylose. L'homoxylane est très rarement rencontré dans la nature. On observe surtout des squelettes substitués par de l'arabinose (liaison α glycosidique sur l'hydroxyle en C3 des xyloses) comme c'est le cas de l'hémicellulose de *N.gaditana* que nous avons caractérisé. Les arabinoxylanes se rencontrent dans les farines de céréales où ils peuvent atteindre 40%. Leur structure plus ou moins branchée et non homogène chez les végétaux supérieurs peut expliquer leur interaction avec les lignines.

La lignine étant absente dans la paroi de *N.gaditana*, l'hémicellulose se trouverait principalement complexée à la cellulose. En vu d'élucider cette liaison nous avons extrait l'holocellulose de *N.gaditana* qui n'est pas un composé pariétal en soi mais l'association cellulose -hémicellulose. L'holocellulose est caractérisée par FT-IR.

3/ Caractérisation de l'holocellulose par FT-IR :

La figure 32 montre un spectre d'absorption FTIR de l'holocellulose. Les bandes 3273 cm^{-1} et 2924 cm^{-1} correspondent aux vibrations élongationnelle des groupements O-H et C-H respectivement (Yue et al ,2012). Selon (Juan I et al ,2008), la bande 1723 cm^{-1} située entre 1765-1715 cm^{-1} correspond à la présence des acides carboxyles, ou aldéhyde de la cellulose. Le pic 1625 cm^{-1} représente le groupement carbonyle. La bande 1525 cm^{-1} représente les vibrations des cycles aromatiques indiquant la présence de protéines

.L'apparition de la bande 1451 cm^{-1} représente les vibrations de déformations des groupements C-H . (Dudkinet et al, 2002). La bande 1049 cm^{-1} indique les vibrations des liaisons glycosidiques C-O-C.

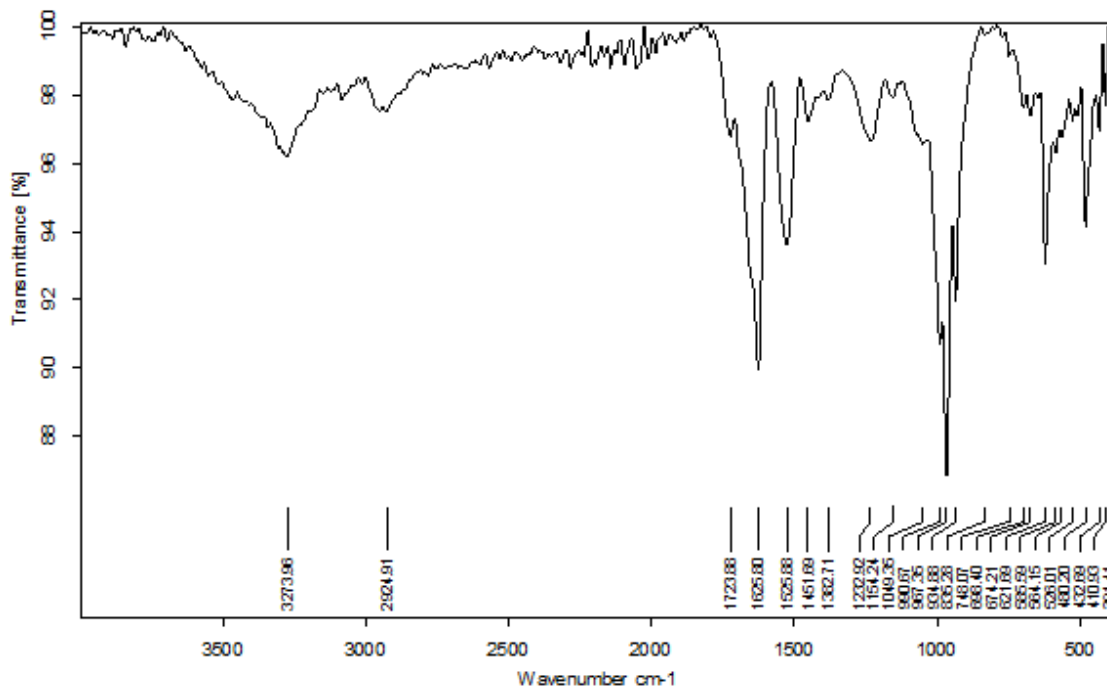


Figure 32: spectre d'absorption FT-IR de l'holocellulose extraite de *Nannochloropsis gaditana*.

Le profil d'absorption FT-IR de l'holocellulose est très proche de celui de la cellulose du fait de la faible quantité d'hémicellulose présente. Les pics spécifiques aux groupements hémicellulosique ne sont pas significatifs dans ce spectre. Dans nombres d'utilisation industrielle de la cellulose, nous n'aurons pas besoin d'un grand état de pureté de cellulose. Dans ces cas l'utilisation de l'holocellulose de microalgues, indemne de lignine et contenant très peu d'hémicellulose peut être envisagée à la place de la cellulose ce qui augmenterait largement le rendement de production.

L'holocellulose ,comme l'hémicellulose et la cellulose microalgale isolées, présentent tous les trois des pics qui correspondraient à la présence de groupement carboxyliques éventuellement lipidiques du fait de la présence d'algaenane pariétale, et de pics de cycles aromatiques liés à la présence de protéines ou peptides.

L'obtention d'une cellulose ultra pure naturelle serait à notre sens impossible à obtenir sans endommager ce polymère, vue la complexité structurale de ce polysaccharide et ses interactions avec les autres molécules pariétales. Cependant dans l'usage pharmaceutique qui semble être le plus exigeant, une faible contamination serait tolérée si le contaminant est identifié et s'il n'est pas néfaste.

Dans ce sens nous nous sommes attelé à analyser plus profondément nos produits sur RMN solide pour une meilleure caractérisation, surtout des contaminants.

4/ Analyse des composés pariétaux de *Nannochloropsis gaditana* par RMN solide:

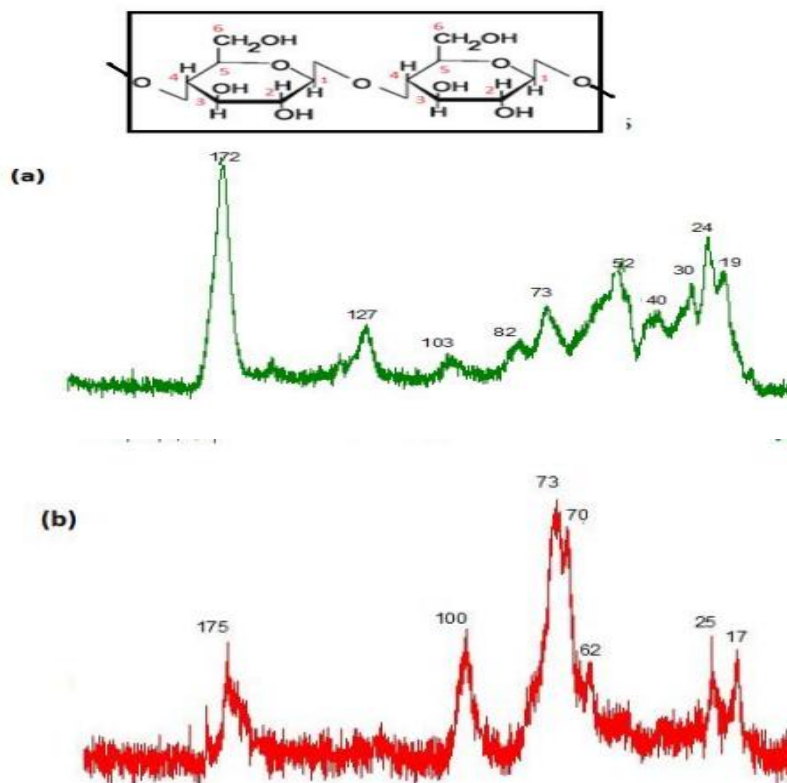
Bien que la technique de choix pour les produits organiques soit plutôt la RMN en solution, la RMN du solide reste incontournable pour les produits insolubles. Elle est de plus en plus utilisée même quand les composés sont solubles et que l'on souhaite avoir des informations sur leur structure à l'état solide : cristallinité, conformation à l'état solide.

L'état solide par résonance magnétique nucléaire RMN est utile pour la cellulose, qui est insoluble dans l'eau et beaucoup de solvants organiques. Cette approche nous permettrait de confirmer ou d'infirmer quant à la présence de lipides qui contamineraient la cellulose extraite. Elle permettrait aussi de mieux caractériser l'hémicellulose et aussi voir de l'existence ou pas de contaminants de lignine dans les extraits pariétaux et donc chez *N.gaditana* et ce en comparaison avec une molécule de lignine commerciale. Cellulose, holocellulose et hémicellulose extraits de *N.gaditana* sont analysés par RMN solide avec des références de cellulose de linter de coton et de lignine (Fig.33 a,b,c,d,e).

Des données bibliographiques servant de base de données permettent de caractériser les pics spectraux de la RMN solide.

La région spectrale à 0-40ppm correspond aux acides gras, 40-60ppm correspondent à C α , 60-70ppm correspond à C6, et 70-81ppm à C2, C3 et C5. La région spectrale 81-93ppm correspond à C4, 102-108 ppm à C1 et 160-180 représentent le groupe carbonyle

La cellulose microalgale, l' hémicellulose et holocellulose affichent des pics d'acides gras à 24, 19 et 25 ppm, respectivement. C2 a été observé à 70 ppm dans tous les échantillons. Les pics de C4 ont été observés dans la lignine et la cellulose de linter de coton en 87 et 89 ppm, pics de cristallinité. La phase non cristalline des autres polymères a été observée en position C4 à 82, 83 et 82 ppm dans l'holocellulose, le linter de coton, la cellulose microalgale respectivement .On a observé deux phases cristallines et non cristallines dans la cellulose de linter de coton. Les pics de C6 à 58, 62 et 62ppm ont été observés pour la cellulose des microalgale, le linter de coton et l' holocellulose. Cependant, aucun pic C6 n'a été observée dans les hémicelluloses et la lignine. En outre, les pics correspondant à C α ont été observés à 40, 36, 35 et 30 ppm , dans la cellulose microalgale, la lignine, l'hémicellulose et l'holocellulose.



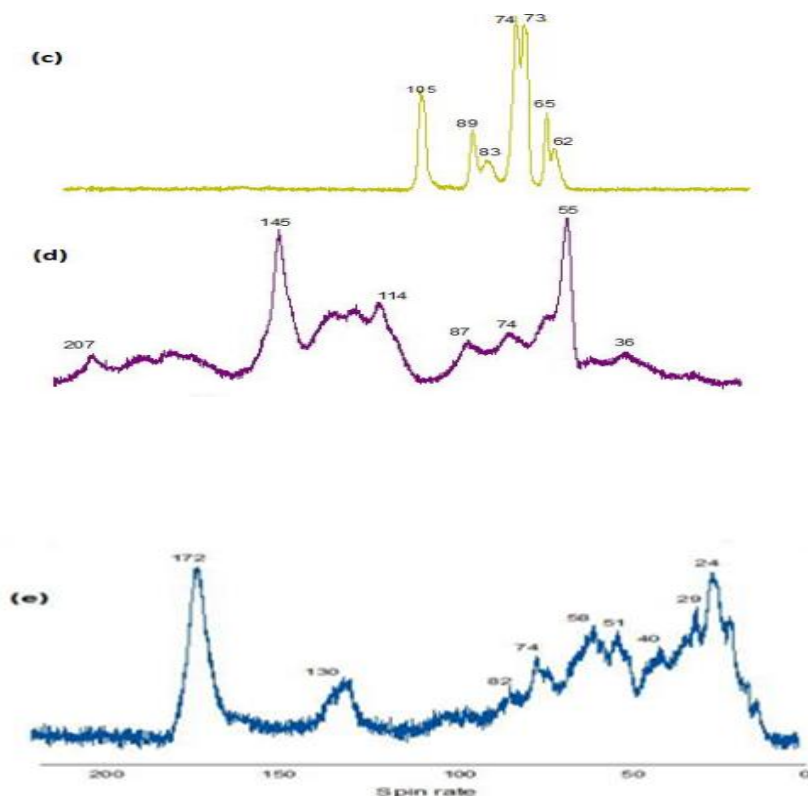


Figure. 33: Spectre CP/MAS ^{13}C -RMN de (a) Holocellulose, (b) Hémicellulose, (c) linter de Cotton, (d) lignine (e) Cellulose microalgale. .

La cellulose de *N. gaditana* ne présente pas de contaminants ligneux. Aucune trace de ce polymère n'existe sur les 3 composés pariétaux isolés. *Nannochloropsis gaditana* ne possède pas de lignine au niveau pariétal. Des acides gras résiduels sont présents au niveau de la cellulose microalgales. Ce seraient des acides gras contaminants provenant de la paroi. Des pics de carbones non identifiés (C_α) restent à déterminer. Seroient ce les peptides contaminants observés par FT-IR?

A partir de ces différentes données nous pouvons proposer une structure de la cellulose microalgale que nous avons obtenu :

A partir de l'analyse FTIR de la cellulose nous pouvons déduire concernant la structure de la cellulose microalgale le radical du groupe ether serait soit H qui serait majoritaire ou du $-\text{CH}_2\text{COO}^-$ et cycle aminés peptidiques qui seraient des contaminants faiblement présents (Fig.34).

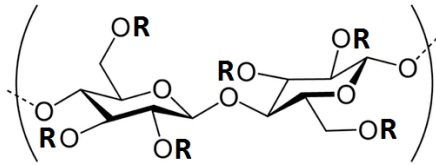


Figure .34: Représentation générale de la structure de la cellulose de *N.gaditana* obtenue :R= H, -CH₂COO-, cycle aminé.

5/ Analyse thermogravimétrique des composés pariétaux de *Nannochloropsis gaditana*

La perte d'eau dans la plage de température (40-120°C) a été observée pour tous les échantillons (Fig.35 a ,b ,c)

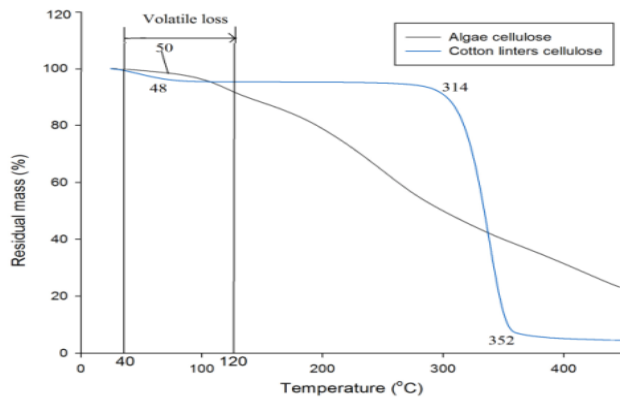
La perte de poids présentée dans le profil TGA, montre la décomposition du matériel biologique (la cellulose microalgale, l'hémicellulose et l'holocellulose). Cette décomposition est caractérisée par la température initiale de décomposition (IDT).

L'IDT de la cellulose microalgale est de 50°C avec une perte de la masse résiduelle de 21% à 450°C (Fig.35 a)

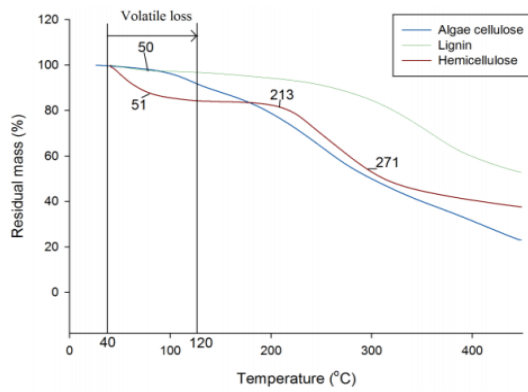
La température initiale de décomposition de l'hémicellulose(Fig. 35b) est de 50°C, avec une perte initiale de la masse résiduelle de 16%, suivie de 24% à Température de 213°C, jusqu'à 27% pour une température de 217°C.

Pour l'holocellulose (Fig.35 c), l'IDT est de 35°C, suivie de deux étapes de dégradations à 226°C et 307°C avec un changement de masse résiduelle de 30% et 34% respectivement.

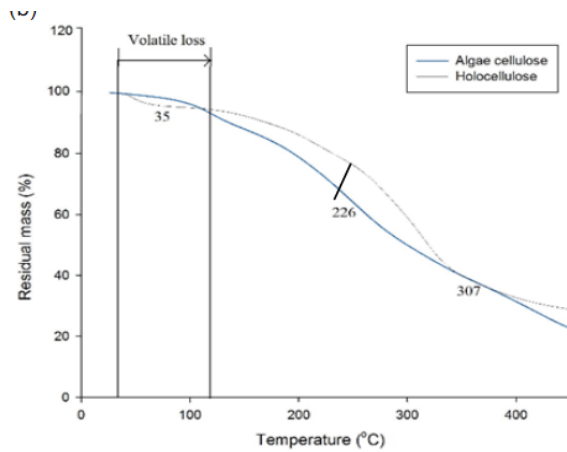
La cellulose de l'inter de coton a montré une perte d'eau initiale de 9% à environ 48°C, ceci a été suivi par 43,5% de changement de poids à 314°C. Une dégradation finale à 352°C avec un changement de 33% en masse résiduelle est observé



(a)



(b)



(c)

Figure.35: Analyse thermogravimetrique de (a) la cellulose microalgale et la cellulose de linter de coton, (b) hemicellulose,lignine et cellulose microalgale , (c) Holocellulose et cellulose microalgale.

6/ Analyse calorimetrie differentielle a balayage

L'analyse DSC (Differential Scanning Calorimetry) (Fig.36) est réalisée sur la base des observations faites à partir des expériences de perte de poids (TGA). Les échantillons sont chauffés jusqu'à 220 ° C et on observe un pic endothermique initial qui correspond à la perte d'eau (70 ± 1 ° C, 95 ± 14 ° C, $67 \pm 0,1$ ° C pour la cellulose, la carboxyméthylcellulose et la méthylcellulose, respectivement). Le pic endothermique de la méthylcellulose à 175 C a été affecté à son point de fusion.

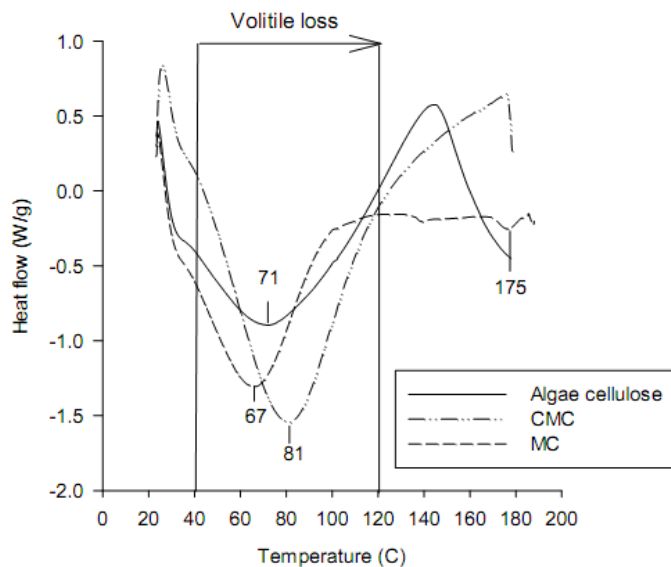


Figure. 36 : Analyse DSC de cellulose microalgale comparée à la carboxyméthylcellulose(CMC) et méthyl cellulose (MC)

7/ Etude des nanoparticules cellulose

Les nanoparticules de cellulose de *N.gaditana* sont obtenues par nanoprécipitation comme décrit en matériel et méthodes.

L'observation au microscope à force atomique montre des particules cellulose microalgales sphériques de $164 \pm 38 \times 171 \pm 21$ nm (hauteur x largeur) (Fig. 37). Cette caractéristique est intéressante vue qu'elle ouvre des perspectives à une éventuelle utilisation de ces nanoparticules en tant qu'excipient dans des aérosols ou pommades vue leur dimension qui permettrait une pénétration de la barrière pulmonaire et de la peau d'autant

plus que ces particules sont insolubles dans l'eau et esterifiables permettant donc la fixation de principes actifs. Le caractère naturel de ces molécules plaide en plus en faveur d'une utilisation à usage humain.

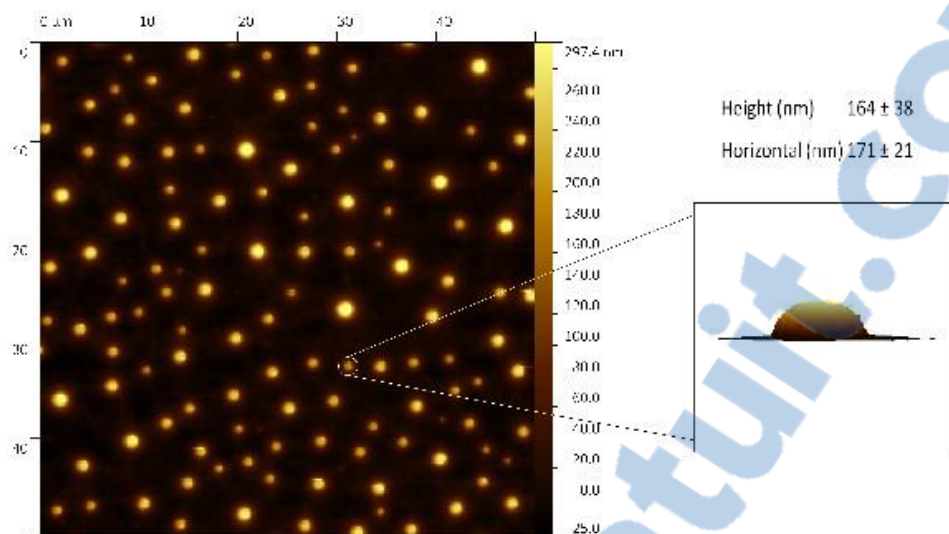


Figure 37: Image sur microscope à force atomique des nanoparticules de cellulose de *N.gaditana* en utilisant le méthanol comme solvant organique.

8/ Effet des métaux lourds sur la croissance de *Nannochloropsis gaditana*

Nous avons testé deux types de métaux traces sur la croissance de *N.gaditana* : le Fer et le cuivre normalement présents à faibles teneurs dans le milieu de culture, dont nous avons fait augmenter la concentration, et le cadmium, qui n'est pas nécessaire à la vie et dont la présence même à très faible concentration est largement reportée comme préjudiciable aux cellules vivantes. (Chiffoleau et al., 2001).

8/a-Effet du cadmium sur *Nannochloropsis gaditana*

Nannochloropsis gaditana est mise en croissance en présence de 10, 50, 100 et 500 ppm de cadmium. La cinétique de croissance en présence d'un témoin sans cadmium est suivie par mesure de l'absorbance à 500 nm (Fig.38) ou de la variation de la densité cellulaire (fig.39). Nous avons utilisé ces deux mesures pour vérifier que la variation de l'absorbance est bien due à une variation de la densité cellulaire et non pas à d'autres facteurs tels une variation de

concentration en chlorophylle due à une augmentation de la taille cellulaire. En effet à 100 ppm alors que la densité cellulaire est deux fois moins qu'à 50ppm, (fig39) le profil absorbance est similaire (fig.38)

En présence du cadmium, *N. gaditana* montre une sensibilité à 10ppm (Fig.39). Au bout de 13 jours de croissance la densité cellulaire diminue à 73.10^5 cellules/ml, soit une réduction de 27% de la densité du témoin. A 50ppm il y a réduction de 45% de la croissance, puis 64% à 100ppm pour s'annuler à 500ppm ou il y a une inhibition de la croissance.

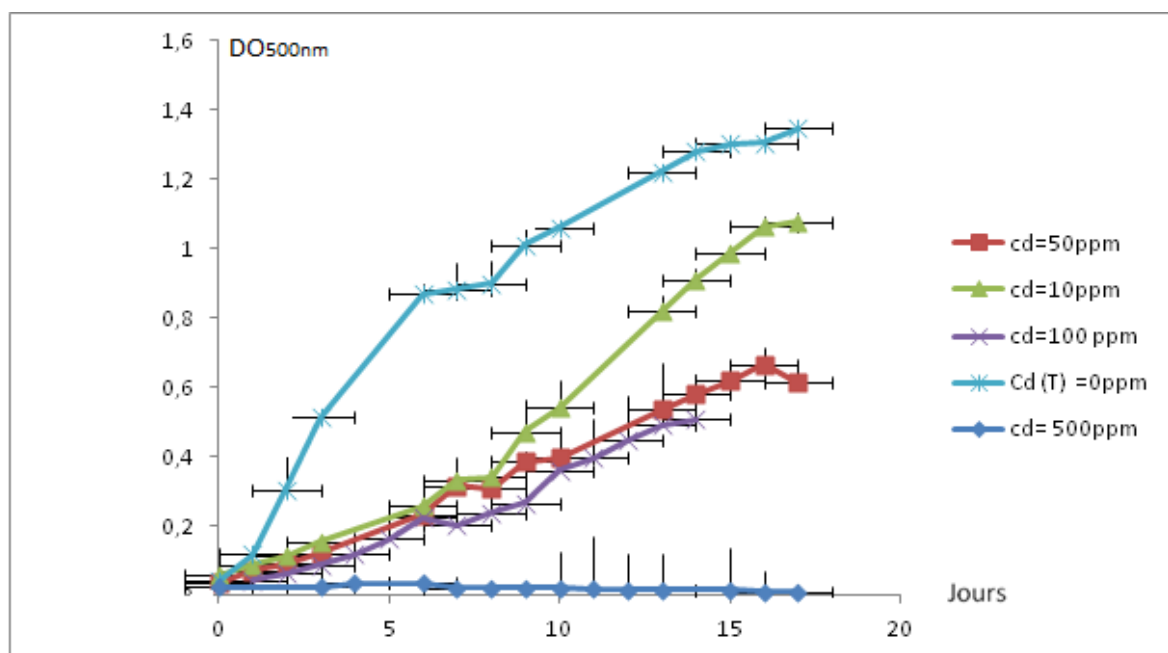


Fig.38 : Effet du cadmium sur la croissance de *Nannochloropsis gaditana*

La croissance est suivie par l'absorbance à 500nm

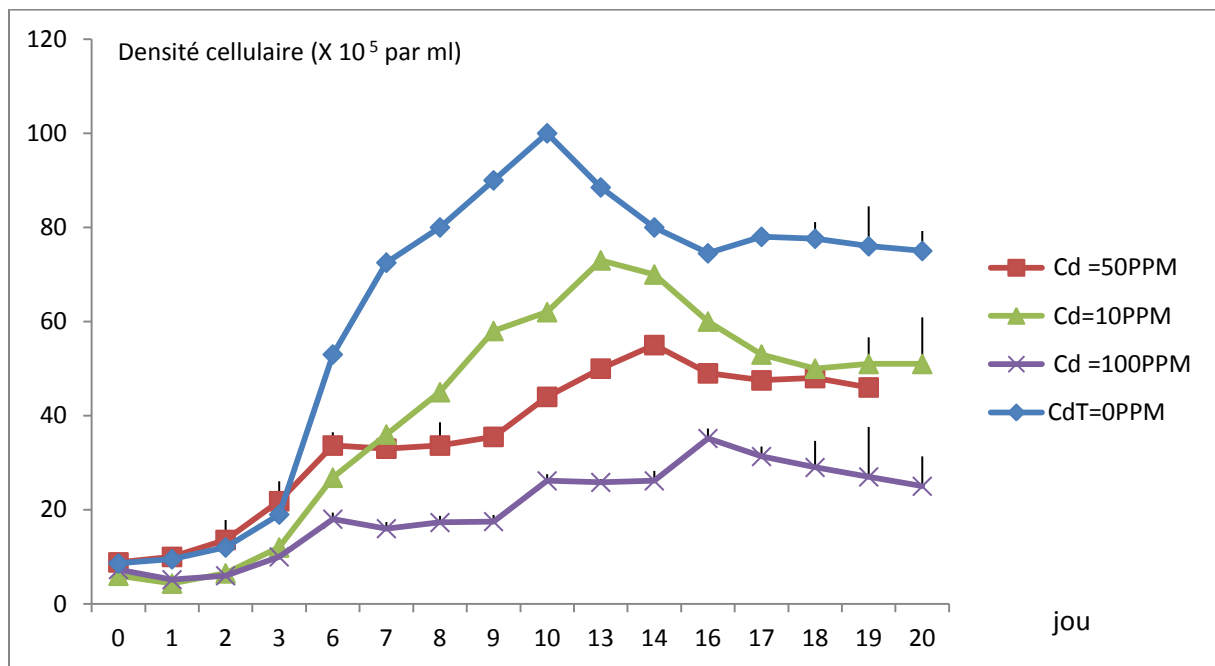


Fig.39 : Effet du cadmium sur la croissance de *Nannochloropsis gaditana*
La croissance est suivie par la densité cellulaire

Le cadmium a un effet toxique sur *N. gaditana*. Cette toxicité peut être exprimée par de nombreux mécanismes réduisant la croissance cellulaire.

Le cadmium peut jouer un rôle compétiteur avec les biomolécules de la chlorophylle. Ce métal peut remplacer le magnésium, qui est un composant essentiel de la chlorophylle, causant ainsi une inhibition de la photosynthèse. (Küpper, Küpper et Spi ller, 1996) Le cadmium perturbe le métabolisme et la multiplication cellulaire. Il agit en formant des complexes avec les acides aminés et les protéines en affectant les propriétés de l'ADN et de la chlorophylle.

Ce métal peut modifier la structure de la cellule en augmentant sa taille jusqu'à son éclatement. En effet nous avons mis des suspensions de *N.gaditana* en présence de fortes concentrations de Cd de 500 à 2000ppm et plus .Nous observons d'abords une augmentation de taille des cellules à 500ppm (Fig.40 a) puis une formation d'amas cellulaire à 1000ppm (Fig . 40b) finalement une lyse cellulaire est observée à 2000ppm (Fig.40c).

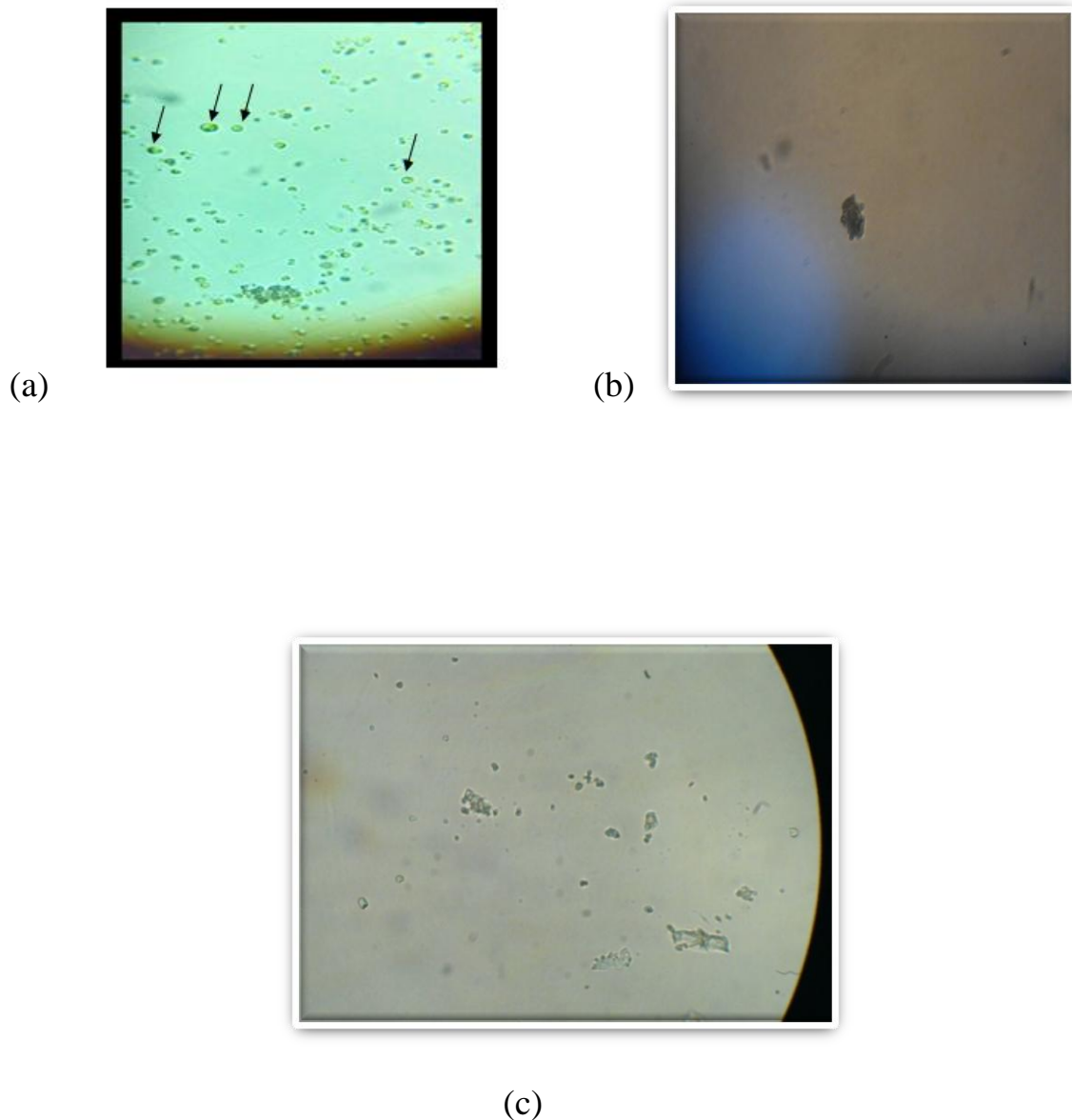


Figure.40 : Observation microscopique de *Nannochloropsis gaditana* (400x): (a) à 500ppm de Cd, les cellules augmentent de taille, (b) 1000 ppm de Cd, formation d'amas cellulaires, (c) 2000 ppm de Cd, éclatement des cellules.

Néanmoins *N. gaditana* bien que sensible au Cd, présente une meilleure tolérance relativement à d'autres espèces de microalgues étudiées. Alors que nous avons observé que *N. gaditana* présentait une croissance résiduelle de 75 et 55% respectivement à 10 et 50ppm de Cd, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella pyrenoidosa* et *Scenedesmus quadricauda* sont sensibles à 2ppm de Cd. D'autres auteurs ont mis en évidence l'effet inhibiteur du cadmium sur la croissance de la diatomée *Chaetoceros tenuissimus* (Desai et al., 2006). Ces auteurs ont observé qu'en présence d'une concentration de 10 ppm, 65% des

cellules de cette espèce sont endommagées, et 50% des cellules étaient apoptiques au bout de 8 jours de contamination.

Nannochloropsis gaditana pourrait être sérieusement envisagée comme microorganisme de bioremediation de milieux aquatiques pollués au cadmium, surtout que cette microalgue a la capacité de se multiplier dans les milieux les plus diversifiés.

Cette tolérance au cadmium serait due à plusieurs phénomènes de défenses :

- Développement des pompes ATP – dépendante qui assurent une faible concentration en métaux dans le milieu intracellulaire.
- Un changement intracellulaire du degré d'oxydation des métaux (Gouvêa et al., 2005), ce qui conduit à des formes métalliques moins toxiques (Pawlik-Skowronska, 2001).
- La complexation entre les ions métalliques et les ligands intracellulaires tels que les acides gras, les polypeptides et les aminoacides, ce qui permet de diminuer la toxicité (Gonzalez – Davila et al., 1995). *Nannochloropsis* est connue pour sa richesse en lipide .Cette dernière peut lui procurer ce mécanisme de complexations.
- Une précipitation des complexes métalliques à la surface des cellules, ou la libération d'exsudats ayant de fortes propriétés complexantes, permettant de modifier la biodisponibilité des métaux (Gouvêa et al., 2005).

En réponse au stress du au Cd, *N. gaditana* peut faire appel à d'autres mécanismes de défense, tels que l'exclusion, la séquestration dans les vacuoles, la synthèse des protéines de stress comme la métallothionéine, qui se complexe avec le cadmium et donne un produit moins toxique. La cellule microalgale peut subir un changement ultrastructural (Clemens, 2001 ; Gimmler et al., 1991 ; Hu, Lau et Wu, 2001 ; Nassiri et al. , 1997 ; Pal et Rai , 2010 ; Spijkennan et al., 2007 ; Visviki et Rachlin , 1994).

La paroi cellulaire de *N.gaditana* possèderait une forte affinité pour le cadmium de par la présence d'une structure lipidique : algaenanes. Cette paroi est fortement chargée négativement du fait des groupes fonctionnels qui y sont associés et qui interagissent fortement avec les cations présents dans le milieu. Cette propriété confère aux cellules une tolérance significative à certains métaux lourds (Monteiro *et al.*, 2012). Une bonne part du Cd du milieu serait donc adsorbée par la paroi.

En vue d'estimer la capacité de biosorption de *N.gaditana* nous avons cultivé cette microalgue en présence de 10ppm et 50ppm de cadmium. Le cadmium résiduel dans le milieu est dosé en fonction du temps par SAA (spectrometrie par absorption atomique)(Fig.41)

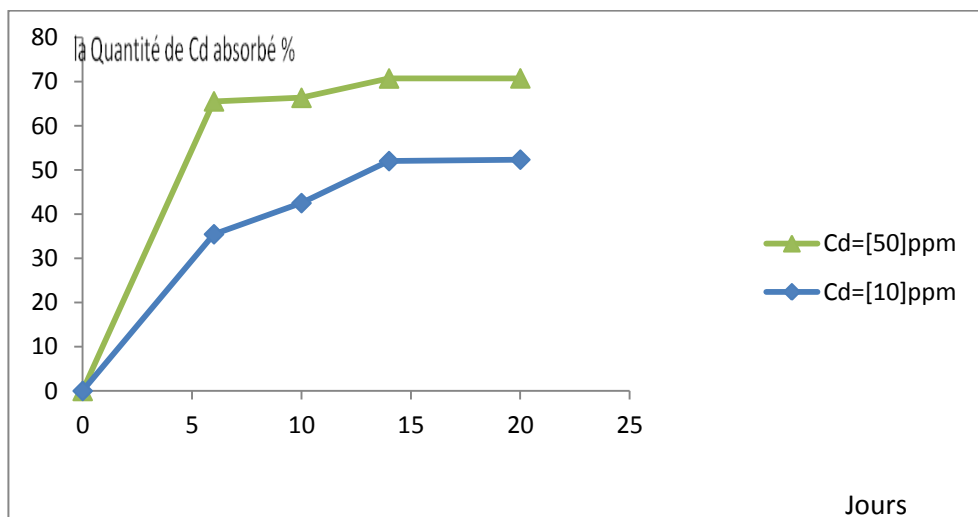


Figure.41. Absorption du cadmium à 10ppm et 50ppm par *Nannochloropsis gaditana*

La figure 41 représente l'absorption du cadmium par *Nannochloropsis gaditana*. L'absorption augmente avec la concentration jusqu'à ce qu'elle se stabilise au bout du 14^{ème} jour où il y a une absorption maximale (saturation) pour les deux concentrations. A 10 ppm elle a absorbée 50% et pour 50ppm elle a absorbé 70%.

Ce phénomène serait dû au fait qu'à concentration relativement élevée en cadmium, la possibilité de contact cellule/cadmium est plus importante. En effet

dés le 6eme jour à 50 ppm la capacité de biosorption cellulaire est de $1.5 \cdot 10^{-5}$ ppm de cadmium séquestré par cellule alors qu'à 10ppm la capacité de biosorption est relativement 10fois moindre (Tab.3).

TABLEAU 3: Relation croissance de *N.gaditana*, concentration en cadmium, cadmium absorbé

	Jours	Jour 6	Jour 10	Jour 14	Jour 20
Croissance à 10 PPM de cadmium	Densité cellulaire /ml	$26 \cdot 10^5$	$58 \cdot 10^5$	$70 \cdot 10^5$	$51 \cdot 10^5$
	Quantité de Cd absorbé en ppm	3.546	4.251	5.202	5.23
	Ppm Cd absorbé/cellule	$0.13 \cdot 10^{-5}$	$0.06 \cdot 10^{-5}$	$0.07 \cdot 10^{-5}$	$0.1 \cdot 10^{-5}$
	Jours	Jour 6	Jour 10	Jour 14	Jour 20
Croissance à 50 PPM de cadmium	Densité cellulaire /ml	$22 \cdot 10^5$	$35,5 \cdot 10^5$	$50 \cdot 10^5$	$46 \cdot 10^5$
	Quantité de Cd absorbé en ppm	32.7	33.17	35.36	35.37
	Ppm Cd absorbé/cellule	$1.5 \cdot 10^{-5}$	$0.97 \cdot 10^{-5}$	$0.7 \cdot 10^{-5}$	$0.76 \cdot 10^{-5}$

8/b-Effet du fer et du cuivre sur la croissance de *Nannochloropsis gaditana*

Les métaux sont souvent indispensables au déroulement des processus biologiques (oligo-éléments). Nombre d'entre eux peuvent s'avérer toxiques ou dangereux pour diverses formes de vie, lorsque leurs concentrations dépassent un seuil, lui-même en fonction de l'état chimique (spéciation) de l'élément considéré. C'est le cas par exemple du fer (Fe), du cuivre (Cu).

Le fer et le cuivre font parti du milieu de culture Guillard. Ils sont à concentration respectives de 3.15g/l et 0.08 ppm.

Nous avons suivi une culture de *N.gaditana* à des concentrations de 4 et 8g/l de fer. Ces concentrations ne semblent pas influencer sur les profils de croissance. En effet les courbes de croissance sont similaires à celle du témoin. (Fig.42)

Aussi le dosage du fer résiduel par SAA dans le surnageant de culture après 13 jours (début de phase stationnaire), révèle que la totalité du minéral a été absorbé ou adsorbé. Le surnageant ne contenait plus de fer.

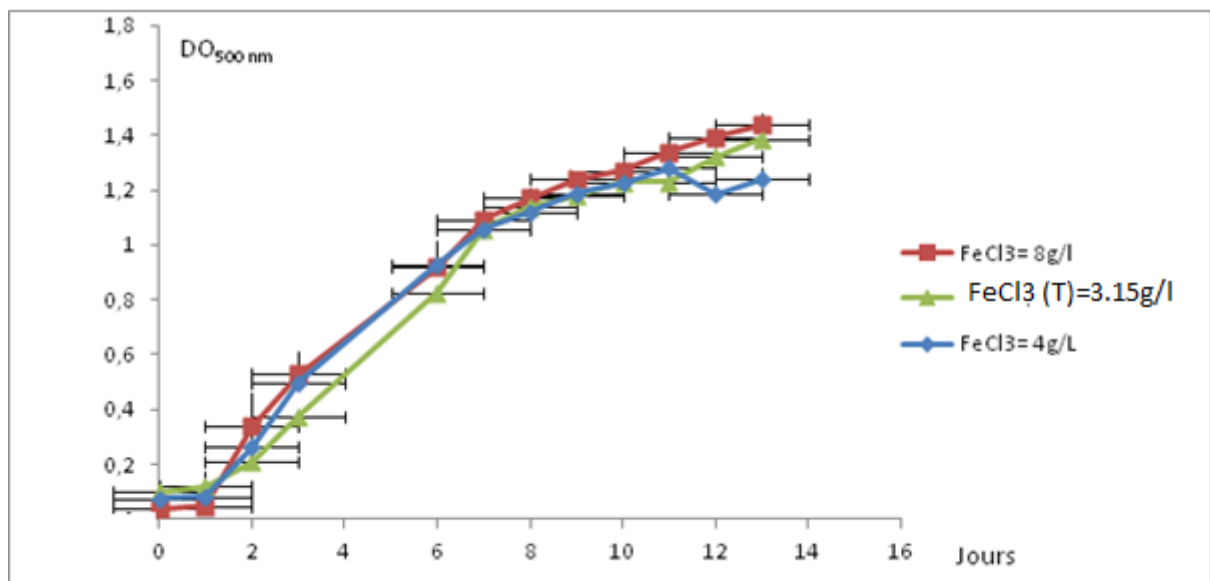


Figure.42 : Effet du fer sur la croissance de *Nannochloropsis gaditana*

Des résultats similaires sont observés avec le cuivre à 0.05ppm et 0.08 ppm(Fig.43).L'augmentation jusqu'à 8 fois la concentration du cuivre du milieu témoin n'affecte aucunement la croissance de *N.gaditana*.La totalité du cuivre est absorbé ou adsorbé après 13 jours . Le surnageant dosé par SAA ne contient plus de cuivre.

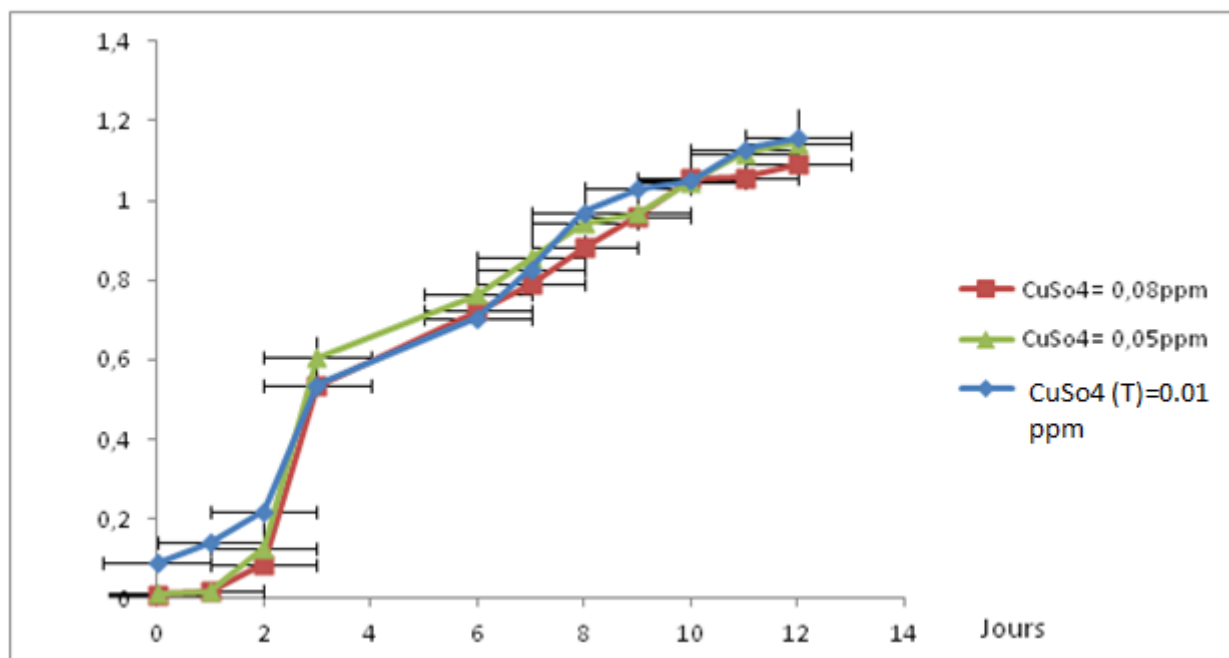


Figure.43 : Effet du cuivre sur la croissance de *Nannochloropsis gaditana*

Chez les dinoflagellés, Lage et al. (1994) ont rapporté une inhibition de croissance de l'espèce *Amphidinium carterae* par le cuivre à faible concentration. Tripathi et Gaur (2006) ont signalé que le cuivre et le zinc induisaient une inhibition de la photosynthèse accompagnée d'une diminution de la croissance et de la consommation de nitrates chez l'espèce *Scenedesmus* sp. En outre, Herzi et al. (2013b) ont rapporté que *Skeletonema costatum* cultivée en présence de cuivre, diminuait sa production de Chl a, caroténoïdes et phéopigments.

Nannochloropsis gaditana outre sa bonne tolérance du cadmium, semble aussi largement résistante à de fortes concentrations de fer et peut croître à des concentrations de cuivre allant jusqu'à 0.08ppm. Cette microalgue serait un bon candidat pour la bioremédiation.

CONCLUSION

L'intérêt pour les microalgues présente un double avantage. Ce sont d'abord des organismes végétaux avec toutes les propriétés intéressantes du végétal de par la photosynthèse qui diminue la teneur atmosphérique en CO₂ et la production d'oxygène, ainsi que la production de métabolites industriellement valorisables avec en plus une diversité largement plus importante que celle des végétaux. Ce sont aussi des microorganismes faciles à produire en masse en continu, adaptables aux milieux les plus extrêmes, possédant les caractéristiques microbiennes permettant aisément leur manipulation génétique et leur transformation. C'est l'outil biotechnologique par excellence.

Notre travail sur *Nannochloropsis gaditana* s'inscrit d'abord dans un aspect purement fondamental de connaissance de la paroi microalgale, des constituants présents, leur configuration et leur valorisation, travaux faisant largement défaut par rapport à cela.

Nannochloropsis gaditana, microalgue de la famille des eustigmatophyceae, fait l'objet de travaux nombreux de par sa richesse en lipides qui peut avoisiner plus de 40% de son poids sec, et trouve son intérêt essentiellement dans la production de biodiesel, d'où les travaux sur sa production en masse et l'optimisation de photobioréacteurs pour le développement de la filière. C'est l'énergie renouvelable par excellence qui trouve son développement ralenti du fait du coût bas des énergies fossiles mais qui est prédestiné à jouer ce rôle dans le futur très proche.

Outre cette filière, sa production en masse pourrait résoudre de grands problèmes sociétaux et environnementaux. Riche en protéines qui peuvent avoisiner les 40% de son poids sec dans certaines conditions de croissance, elle peut fournir un additif alimentaire protéique pour l'aliment de bétail, et comme protéine végétale de substitution aux protéines animales, sujets à grandes controverses

sanitaires, présents dans de nombreuses préparations notamment le lait pour bébé.

D'un point de vu environnemental, une production en masse permettrait d'atténuer le réchauffement climatique. La production d'un gramme de microalgue permet de séquestrer 1.8g de CO₂.

Aussi la déforestation une plaie dans les forets tropicales et autres poumons terrestre, est pour une grande part liée aux grands besoins mondiaux en cellulose. Elle peut être atténuée par une production cellulosique microalgale qui pourrait à notre sens remplacer la cellulose végétale et pour cause :

Nannochloropsis gaditana est riche en cellulose, soit 25% de son poids sec et pourrait être augmenté dans des conditions de croissance spécifique. Cette cellulose est plus simple à extraire, vu qu'elle ne contient pas de lignine. Une extraction à très faible concentration en NaOH permet d'obtenir une cellulose présentant les caractéristiques d'une cellulose végétale laquelle a nécessité des modes d'extraction chimique agressives pour son isolement. L'hémicellulose présente en quantité dans la paroi végétale ne représente que 1.5% du poids sec microalgal. La quantité restante associée à la cellulose serait donc non significative comme nous l'observons dans nos travaux. De ce fait le rendement cellulosique microalgal serait d'avantage plus important en utilisant directement de l'holocellulose (complexe cellulose hémicellulose) au lieu de la cellulose dans les domaines ou une grande pureté de cellulose n'est pas nécessaire, ce qui réduirait l'usage des solvants et l'économie d'énergie, l'extraction de l'holocellulose étant plus simple.

A partir de la cellulose microalgale, nous avons produit des nanoparticules présentant des tailles intéressantes pour l'industrie pharmaceutique et cosmétique. Ces particules de par leur taille pourraient traverser la barrière cutanée et pulmonaire d'où leur usage éventuel comme excipient pour pommades et gels mais surtout pour un usage en excipient d'aérosol. Cependant des études encore en cours sont menées pour déterminer statistiquement la taille de ces particules obtenues par nanoprécipitation et leur dispersion en solution. Des travaux sont envisagés aussi avec notre partenaire étranger sur des essais de fixation de principes actifs sur ces nanoparticules pour un usage en aerosol d'un médicament initialement utilisé par voie parentérale.

Dans un autre domaine, les microalgues ont le pouvoir de croître dans les eaux usées. Elles utilisent la matière organique de ce milieu comme source de nutriments et résistent à différents matériaux nocifs présents dans ces milieux

(pesticides , métaux lourds,). Cette capacité est utilisée en vue de l'épuration des eaux usées réutilisables pour l'agriculture et d'une autre part nombre de recherches suggèrent leur utilisation dans la régénération des milieux contaminés aux pesticides ou encore aux métaux lourds. Nous avons montré en effet pour *Nannochloropsis gaditana* son grand pouvoir de séquestration de certains métaux lourds. Son pouvoir d'abord exceptionnel d'absorption totale de quantité de fer et cuivre allant jusqu'à respectivement 2 et 8 fois la concentration nécessaire à sa survie, sans affecter nullement sa croissance. Mais aussi en présence d'un métal comme le cadmium, un grand déchet de l'industrie, notamment automobile, connu pour sa grande nuisance, même en état de trace, pour les cellules vivantes, *N.gaditana* maintient jusqu'à 65% de sa croissance à de fortes concentrations de 50 ppm de Cd alors que 2% y est létale pour d'autres microalgues. *Nannochloropsis gaditana* est un candidat sérieux à développer dans le cadre de la bioremédiation.

Source de la vie, ces microorganismes photosynthétiques présentent d'énormes potentialités pouvant à même de résoudre d'énormes problèmes liés à la pollution, la forte industrialisation, les besoins croissants énergétiques, alimentaires et sanitaire des populations humaines en perpétuels croissance... Il est de toute premières nécessités que des petits pays comme le notre développent une stratégie de recherche et de production en masse de ces organismes à l'origine de la vie sur terre...et pouvant encore être d'un grand secours.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Alder E .(1977). Lignin chemistry : past , present and future.Wood science and technology. 11: 169-218
- Alvarez VA; Vazquez A (2006) .Influence of fiber chemical modification procedure on the mechanical modification procedure on the mechanical properties and water absorption of materBi/sisal fiber composites. journal of composites part a applied science and manufacturing 37(10):1672-1680
- Andersen R A .(1992) . Diversity of eukaryotic algae. Biodiversity and Conservation, 1(4), 267–292.
- Andersen R A ;Brett R W; Potter D; Sexton J P. (1998). Phylogeny of the Eustigmatophyceae based upon 18S rRNA gene, with emphasis on Nannochloropsis. Journal of Protist 149:61-74.
- Armbrust E V et Bowler C. (2008). A Model for Carbohydrate Metabolism in the Diatom Phaeodactylum tricornutum Deduced from Comparative Whole Genome Analysis. PLoS ONE 3 1: e1426.
- Assunção P; Jaén-Molina R;Caujapé-Castells J; Jara A; Carmona L; Freijanes K; Mendoza H.(2011). Phylogenetic position of Dunaliella acidophila (Chlorophyceae) based on ITS and rbcL sequences. Journal of Applied Phycology, 24(4), 635–639.
- Attilio Converti; Alessandro A; Casazza ;Erika Y; Ortiz; Patrizia Perego; Marco Del Borghi .(2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of Nannochloropsis oculata and Chlorella vulgaris for biodiesel production. Journal of Chemistry. Engineering . Process.48 : 1146–1151
- Barbat,A (2009).Extraction, caractérisation chimique et valorization biologique de glucuronoxylanes de bois de chataignier . Developpement de

nouveaux procédés de délignification. Thèse de doctorat : Chimie appliquée – Chimie des substances Naturelles. Limoges : Université de Limoges.216p

- Becker E W.(1994). Microalgae Biotechnology and microbiology. Cambridge Press University.

- Benemann J; Woertz I.(2012) . Life Cycle Assessment for Microalgae Oil Production, 1(2), 68–78.

- Biddanda B et Benner R. (1997). Carbon, nitrogen and carbohydrate fluxes during the production of particulate and dissolved organic matter by marine phytoplankton. Limnology. Oceanography. 42 (3): 506 - 518.

- Binet S ; Malard S ;Ricaud M;Remeo –Hariot A; Savary B. (2011).Fiche Toxicologique: Fibres de cellulose.p1-9.

- Blackwell J ;Kolpak F J ;Gardner K H .(1977) .Structure of native and regenerated celluloses . ACS Symposium Series ,48,42-55.

- Bondioli P ; Della Bella L; Rivolta G; Chini Zittelli G; Bassi N; Rodolfi L, Casini D; Prussi M; Chiaramonti D et Tredici MR (2012) Oil production by the marine microalgae *Nannochloropsis* sp. F&M-M24 and *Tetraselmis suecica* F&M-M33.J Bioresour Technology 114: 567-672

- Corteggiani Carpinelli E □ Telatin A, Vitulo N, Forcato C, Angelo M, Schiavon R Vezzi A, Giacometti G M, Morosinotto T, Vallevarez .G Molecular Plant (2014) 7 (2): 323-335Chromosome scale genome assembly and transcriptome profiling of *Nannochloropsis gaditana* in nitrogen depletion. Molecular Plant 6: 323-335.

- Bongiovani N; Popovich C ; Martínez AM ; Freije H; Constenla D & PI Leonardi PI . (2013). In vivo measurements to estimate culture status and neutral lipid accumulation in *Nannochloropsis oculata* CCALA 978: implications for biodiesel oil studies. Algological Studies 142: 3-16.

- Brown Jr RM; Saxena IM; Kudlicka K . (1996). Cellulose biosynthesis in higher plants. Trends Plant Sci. 1:149-156.

- Buffile J. (1988) . Complexation reactions in aquatic systems, Analytical Chemistry, Ellis Horwood, Chichester.

- 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.

- Cao S; Zhang X ; Fan X ; Qiao H; Liang C; Xu D; Mou S; Wang W et Ye N. (2013). Phylogeny and characterization of *Nannochloropsis oceani* ca var. *si nensis* var. nov. (Eustigmatophyceae), a new oleaginous alga from China. Phycologia 52: 573-577.

- Capek P; Machová E et Turjan J. (2009). *Scavenging and antioxidant activities of immunomodulating polysaccharides isolated from Salvia officinalis* L. international Journal of Biological Macromolécules.44,74-80

- Carlsson A S; van Beilen J B; Möller R et Clayton D.(2007) .Micro- and Macro algae: utility for industrial applications, in “EPOBIO: Realising the

Economic Potential of Sustainable Resources – Bioproducts from Non-food Crops”, CPL Press, Berks, 2007.

- Cavalla M. (2000). LES MICROALGUES, http://mcavalla.free.fr/rsr/Algues_operon.pdf.

- Charlton W; Haworth W N; Peat S; Journal of the Chemical Society., 1926, 89-101.

- Chen; C-L. (1991). Lignin: Occurrence in woody tissues, isolation, reactions, and structure. In Wood Structure and Composition, M. Lewin and I.S. Goldstein, eds (New York Marcel Dekker), pp. 183-261

- Chiffolleau J; Auger D; Chartier E; Michel P; Truquet I; Gonzalez J L et Romana L A. (2001) . Spatiotemporal changes in cadmium contamination in the Seine estuary (France). Estuar. Coast 24: 1029-1040.

- Chiffolleau J; Auger D; Chartier E; Michel P; Truquet I; Gonzalez J L et Romana L A. (2001) . Spatiotemporal changes in cadmium contamination in the Seine estuary (France). Estuar. Coast 24: 1029-1040.

- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances 25 (3), 294–306

- Chu S C; Jeffrey G A. *Acta Crystallogr. Sect. B: Structural Science*. 1968, 24, 830-838.

- Cipriani TR; Mellinger CG; Souza LM; Baggio C H; Freitas C S; Marques M C A; Gorin P A J; Sasaki G L; Iacomini M. (2008). Acidic heteroxylans from medicinal plants and their anti-ulcer activity. Carbohydrates Polymers . 74, 274–278.

- Claisse N. (2012). Préparation et modification d'oligosaccharides de cellulose par chimie douce bio-inspirée. Thèse en sciences de l'agriculture. Université de Grenoble, France.

- Clemens S. (2006) . Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. Biochimie 88: 1707–1719.

- Clemens, S. (2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. Planta, vol. 212, no 4, p. 475-486.

- Collard J-M; et R F Matagne. (1990). Isolation and genetic analysis of Chlamydomonas reinhardtii strains resistant to cadmium. Applied and Environmental Microbiology, vol. 56, no 7, p. 2051 -2055.

- Cosson RP. (1992). Les métallothionéines. Anal. Mag. 6: 50-53.

- Crist R H; Martin J R.; Guptill P W; Eslinger J M et Crist D R. (1990) . Interaction of metals and protons with algae. 2. Ion exchange in adsorption and metal displacement by protons. Environment Science Technology. 24: 3373-342.

- Crist R.H; Oberholser K; McGarrity J; Crist D.R; Johnson J.K et Brittsan J M. (1992). Interaction of metals and protons with algae. 3. Marine algae, with emphasis on lead and aluminium. Environment . Sci. Technology . 26: 496-650.

- Croft M T; Warren M J; Smith AG; (2006). Algae need their vitamins. Eukaryotic cell, 5(8), 1175–83. Dismukes G.C., Carrieri D., Bennette N.,

Ananyev G.M., Posewitz M.C., 2008. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Current opinion in biotechnology*.19 (3), 235–40.

- Dabbadie L. (1992). Cultures intensives de micro-algues sur lisier de porc: performances, contraintes, utilisation des biomasses. DAA, ENSA, Montpellier, France:123p

- Demirbas L and Demirbas M F. (2010). *Algae Energy: Algae as a New Source of Biodiesel*. Springer ,London.

- Desai S R; Verlecar X N et Goswami U. (2006). *Ecotoxicology*. 15: 359-363.

- Dhepe P L et Sahu R.(2010). A solid-acid-based process for the conversion of hemicellulose, *Green Chemistry Journal*.12(12), 2153-2156.

- Didderen I ;Destain J ;Thomart P.(200). Le bioethanol de seconde generation :la production de l'ethanol à partir de biomasse lignocellulosique. Les presses agronomiques de Gemblou.p.18

- Dong HP, Williams E, Whang D, X Zhang; R Hsia; A Jenck; R Halden; J Li; F Cheng & AR Place. (2013) .Responses of *Nannochloropsis oceanic IMET1* to long-term nitrogen starvation and recovery. *Plant Physiology* 162: 1110-1126

- Droop M R. (2007). Vitamins, phytoplankton and bacteria: symbiosis or scavenging. *Journal of Plankton Research*. 29(2):107–113.

- Duarte, C. M.(2002). The future of seagrass meadows, *environmental conservation journal*.,29, 192–206.

- Duret X; Fredon E; Masson E ; Desharnais L ; and P Gérardin.(2013) .Optimization of Acid Pretreatment in order to Increase the Phenolic Content of *Piceaabies* Bark by Surface Response Methodology. “Phenolics in spruce bark” *BioResources* 8(1), 12:273-581.

- Engel D W (1987). Metal regulation and molting in the blue crab, *Callinectes sapidus*: Copper, zinc, and metallothionein. *Journal of Biology Buletin*. 172: 69-82.

- Errécalde O et Campbell P G C. (2000). Cadmium and zinc bioavailability to *Selenastrum capricornutum* (Chlorophyceae): accidental metal uptake and toxicity in the presence of citrate. *Journal of Phycology* . 36: 473-483.

- Falkowski P.G., Raven J.A., 1997. *Aquatic Photosynthesis*. Blackwell Science.

- Farkas E et Sóvágó I (2002). Metal complexes of amino acids and peptides. In: Amonoacids, peptides and proteins. Royal society of chemistry, *Special Periodical Reports* 33: 295-364.

- Fawley KP et Fawley MH . (2007). Observations on the diversity and ecology of freshwater *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) with descriptions of new taxa. *Protist* 158: 325-336.

- Fengel D; Wegener G (1984) .*Wood chemistry, ultrastructure, Reactions*. Walter de Gruyter, Berlin.

- FINK H.P ; WALENTA E ; KUNZE J ; MANN G.(1997) In *Cellulose and Cellulose Derivatives, Physico-chemical Aspects and Industrial Applications*. ISOGAI, A. *Cellulose*, 4: 99-107 .
- Folmer F; Jaspars M; Dicato M; Diederich M. (2010). Photosynthetic marine organisms as a source of anticancer compounds. *Phytochemistry Reviews* 9(4), 557–579.
- Folmer F.;Jaspars M.; Dicato M; Diederich M; (2010). Photosynthetic marine organisms as a source of anticancer compounds. *Phytochemistry Reviews*, 9(4), 557–579.
- Fowler B.A., Hildebrand C.E., Kojima Y. et Webb M. 1987. Nomenclature of metallothionein. *Experientia. Suppl.* 52: 19-22.
- Freudenberg K.(1968). The constitution and biosynthesis of lignin.In *Constitution and Biosynthesis of Lignin*, K. Freudenberg and A.C. Neish, eds (New York: Springer-Verlag), pp. 47–74.
- Friese, H., Hess, K., *Zur cellobiosebildung ; III. Mitteilung über die Acetolyse der Cellulose, Ann.*, 1927, 456, 38-54.
- Gatenholm P and Tenkanen M .(2003).ACS symposium series , *Hemicelluloses: Sciences and Technology* .Eds.Washington.
- Gaudinski J B; Dawson T. E ; Quideau S; Schuur E A .G; Roden J.S ; Trumbore S E ; Sandquist D .R; Se-Woung Oh; R. E. Wasylishen; (2005) Comparative analysis of cellulose preparation techniques for use with ¹³C, ¹⁴C, AND ¹⁸O isotopic measurements. *J.Analytical Chemical* . 77: 7212-7224.
- Gavis J; Guillard R R L et Woodward BL. (1981). Cupric ion activity and the growth of phytoplankton clones isolated from different marine environments. *Journal Of Marine Research* . 39: 315 – 333.
- Gimmler H ; Treffny B ; Kowalski M et Zimmermann U. (1991). The resistance of *Dunaliella acidophila* against heavy metals : the importance of the zeta potential. *Journal of Plant Physiology*. 138; 708-716.
- Gimmler H. (2001). Acidophilic and acidotolerant algae. In *Algal Adaptation to Environmental Stresses. Physiological, Biochemical and Molecular Mechanisms*,p. 259-290.
- Godet S .(2008). Isolement et caractérisation de trois gènes codant une lipase et deux estérases hypothétiques chez la microalgue marine *isochrysis galbana* (Prymnesiophyceae, Haptophyta). Thèse de doctorat : Biophysiology des organismes et des populations. Université de Maine, 235p .
- Goering J J; Wallen D D et Naumann R M.(1970) . Nitrogen uptake by phytoplankton in the discontinuity layer of the eastern subtropical Pacific Ocean. *Journal of Limnology Oceanography*. 15: 789-796.
- Gonzàles-Dàvila M ; Santana-Casiano J M et Perez-Pena J. (1995) . Binding of Cu (II) to the surface and exudates of the alga *Dunaliella tertiolecta* in seawater. *Environement . Science. Technology*. 29: 289 – 301.

- González-Fernández C; Sialve B; Bernet N; Steyer J-Ph; (2012) : "Comparison of ultrasound and thermal retreatment of *Scenedesmus* biomass on methane production", *Bioresource Technology*, 110:610-6
- Gouvêa S P; Vieira A A H et Lombardi A T. (2005). Copper and cadmium complexation by high molecular weight materials of dominant microalgae and of water from a eutrophic reservoir. *Chemosphere* 13:321- 339.
- Gouveia L .(2011). *Microalgae as a Feedstock for Biofuels*. springer ,London 1-69.
- Greene B et Darnall DW (1988). Temperature Dependence of Metal Ions Sorption by *Spirulina*. *Biorecovery* 1: 27-41.
- Grill E; E L Winnacker et M H Zenk. (1985). Phytochelatins: the principal heavy metal complexing peptides of higher plants». *Science*. 230: p. 674- 676.
- Haworth W N.(1925) *Nature*. 116-430.
- Haworth W; Learner N; 1928. *JACS*, 619-625.
- Hendricks AT; Zeeman G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* 100:10–108.
- Hensel A; Schemidgall J ;Kreis W .(1998).The plant cell wall –A potential source for pharmacologically active polysaccharides.*Pharmaceutica Acta Helvetiae* . 73:37-43.
- Herzi F ; Jean N; Zhao Huiyu; Mounier S; Mabrouk H H et Sakka Hlaili A (2013). Copper and cadmium effects on growth and extracellular exudation of the marine toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*: 3D-fluorescence spectroscopy approach. *Chemosphere* 93: 1230-1239. .
- Herzi F; Sakka Hlaili A ; Le Poupon C ; Mabrouk H.H et Mounier S (2013). Characterization of exudates released by the marine diatom *Skeletonema costatum* exposed to copper stress: a 3D-fluorescence spectroscopy approach. *Biometals* 26: 773-781.
- Hibberd D J. (1981).Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes Eustigmatophyceae (synonym Xanthophyceae) . *Botanic Journal Linnean Society* 82:93-119
- Hibberd DJ. (1981). Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (synonym Xant hophyceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 82: 93-119.
- Honjo G ; Watanabe M.(1958) . *Nature*: 181, 326-328.
- Hromádková Z and Ebringerová A.(1995) . Isolation and Characterization of Hemicelluloses of Corn Hulls. *Chemical Papers* 49(2)97—101.
- Hu Q ; Sommerfeld M ; Jarvis E ; Ghirardi M ; Posewitz M ;Seibert M ; Darzins A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 54(4), 621–39.
- Hu S K W K; Lau M et Wu. (2001). Cadmium sequestration m *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Science* 161 : 987-996.
- Hu S ; Lau K W et Wu M. (2001). Cadmium sequestration m *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Science* vol. 161 , no 5, p. 987-996.

- Hudson R J M. (1998) . Which aqueous species control the rates of trace metal uptake by aquatic biota, Observations and predictions of non-equilibrium effects. *Sci. Total Environ.* 219: 95-115.
- Irvine J.C., Hirst, E.L. (1922), *Journal of the chemical society* .121, 1585.
- Jorge M S; Rocha ; Juan E C; Garcia Marta H F. Henriques .(2003) .Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana* .*Biomolecular Engineering* 20 : 237_242
- Juan, I; Moràn ; Vera; Alvarez A ; Viviana P; Cyras ; Analia Vasquez. (2008) . Extraction of cellulose and preparation on nanocellulose from sisal fibers. *Journal of Cellulose* 15 :149-159
- Kačuráková M. Belton P S; Wilson R H; Hirsch J et Ebringerová A. (1998). Hydration properties of xylan-type structures:An FT-IR study of xylooligosaccharides. *Journal of Science Food and Agriculture* . 77(1), 38-44.
- Kacurakova; M; Ebringerova A; Hirsch J et Hromadkova A. (1994). Infrared study of arabinoxylan, *Journal. Science. Food and Agriculture* . 66(3), 423-427.
- Kadam K .(2002). Environmental implications of power generation via coal-microalgae cofiring. *Energy*, 27(10), 905–922.
- Kandilian, R; Lee, E; Pilon L; (2013). Radiation and optical properties of *Nannochloropsis oculata* grown under different irradiances and spectra. *Bioresource Technology* 137, 63–73
- Kardosova A; Malovikova A ; Patoprsty V; Nosal'ová G; Matáková T. (2002).Structural characterization and antitussive activity of a glucuronoxylan from *Mahonia aquifolium* (Pursh) Nutt. *Carbohydrate polymers*,47:27-33.
- Karlson B; Potter D; Kuylenskierna M; Andersen R A . (1996) Ultrastructure, pigment composition, and 18S rRNA gene sequence for *Nannochloropsis granulata* sp. nov. (Monodopsidaeaceae, Eustigmatophyceae), a marine ultraplankter. *Journal of Phycologia* 35: 253-260.
- Karlson B; Potter D; Kuylenskierna M & Andersen R. (1996). Ultrastructure, pigment composition, and 18S rRNA gene sequence for *Nannochloropsis granulata* sp. nov.(Monodopsidaeaceae, Eustigmatophyceae), a marine ultraplankter isolated from the Skagerrak, northeast Atlantic Ocean. *Phycologia* 35: 253-260.
- Klemm D;Philipp B;Heinze T ;Heinze U ;Wagenknecht W .(1998) *Comprehensive cellulose chemistry :, Fundamentals and analytical Methods.* Weinheim :Wiley-VCH 1998.
- Knuckey R M .(1998). Isolation of Australian Microalgae and Preparation of Microalgal Concentrates for use as Aquaculture Feeds . *PhD Thesis University of Tasmania.* 254 pp.
- Krienitz L; Hepperle D ; Stich H B ; Weiler W (2000) . *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae); a new species of picoplankton from freshwater. *Journal of Phycologia* 35: 219-227.

- Krienitz L, D Hepperle, HB Stich & W Weiler. (2000). *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae), a new species of picoplankton from freshwater. *Phycologia* 39:219-227.
- Kroth P G; Chiovitti A; Gruber A; Martin-Jezequel V; Mock T; Parker M S; Stanley M S; Kaplan A; Caron L; Weber T; Maheswari U; Armbrust, E V et Bowler C. (2008). A Model for Carbohydrate Metabolism in the Diatom *Phaeodactylum tricornutum* Deduced from Comparative Whole Genome Analysis. *PLOS ONE* 3 (1): 1426.
- Küpper H ; F. Küpper M Spiller. (1996) . Environmental relevance of heavy metal -substituted chlorophylls using the example of water plants . *Journal of Experimental Botany*. 47: 259-266.
- Lage O M ; Parente A M; Soares H M V.M ; Vasconcelos M T S D et Salema R. (1994) . Some effects of copper on the dinoflagellates *Amphidinium carterae* and *Prorocentrum micans* in batch cultures. *European Journal of Phycology*. 29: 253 – 260.
- Landry M R et Hassett R P. (1982). Estimating the grazing impact of marine microzooplankton. *Marine Biology* . 67: 283-288.
- Leavitt S W; Danzer; S R.(1993) Method of batch processing small wood samples to holocellulose of stable –carbon isotope analysis. *Analytical Chemical*. 65: 87-89.
- Levine R B; Costanza-Robinson MS; Spatafora G A.(2011). *Neochloris oleoabundans* grown on anaerobically digested dairy manure for concomitant nutrient removal and biodiesel feedstock production. *Biomass and Bioenergy*, 35(1), 40–49.
- Liang C.Y et Marchessault ,R,H .(1959).Infrared spectra of crystalline polysaccharides. I. Hydrogen bonds in native celluloses .*Journal polymer science*,39,269-278.
- Lin F H . (2007). Knowledge sharing and firm innovation capability: an empirical study. *International Journal of Manpower*. 28 Iss: 3/4, pp.315 – 332.
- Ling X Q ; Lu D Q ; Wang J; Tu Q B; Ren W et Ouyang P K. (2009) . Optimization of enantio selective production of chiral epichlorohydrin catalyzed by a novel epoxide hydrolase from domestic duck liver by response surface methodology. *African Journal of Biotechnology* . 8: 5534-5541.
- LIU H ; HUANG C ; DONG W ; DU Y; BAI X et LI X; (2005). Biodegradation of xanthan by newly isolated *Cellulomonas* sp. LX, releasing elicitor-active xantho-oligosaccharides-induced phytoalexin synthesis in soybean cotyledons. *Process biochemistry*, 40: 3701-3706.
- Lorenzo J I ; Nieto-Cid M ; Alvarez-Salgado X A ; Perez P et Beiras R. (2007) . Contrasting complexing capacity of dissolved organic matter produced during the onset, development and decay of a simulated bloom of the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Marine Chemistry* . 103: 61 – 75.
- Lubián L M (1982). *Nannochloropsis gaditana* sp. nov., una nueva Eustigmatophyceae marina. *Journal of Lazaroa* 4: 287-293.
- Macedo M F; Miller A Z; Dionísio A; Saiz-Jimenez C.. (2009). Biodiversity of cyanobacteria and green algae on monuments in the

Mediterranean Basin: an overview. *Microbiology* (Reading, England), 155(11), 3476–90.

- Margesin R; Miteva V. (2011). Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Research in microbiology*, 162(3), 346–61.
- Mata T M ; Martins A A ; Caetano N S ; (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications, [Renewable & Sustainable Energy Reviews](#). 14, 217-232.
- [Matsunaga T¹](#); [Takeyama H](#); [Nakao T](#); [Yamazawa A](#). (1999). Screening of marine microalgae for bioremediation of cadmium-polluted seawater. *Journal of Biotechnology* 70 (1-3):33-8.
- [Meyer K H](#) ; [Misch L](#); *Helvetica Chimica Acta*, 20, 232-245.
- Miao X; Wu Q et Yang C. (2004). Fast pyrolysis of microalgae to produce renewable fuels. *Journal of Applied Pyrolysis*.71:855-863
- Midorikawa T et Tanoue E. (1998) . Molecular masses and chromophoric properties of dissolved organic ligands for copper (II) in oceanic water. *Marine Chemistry* . 62: 219-239.
- Milledge J. (2011). Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 10(1), 11.
- Miquel M; (2001). Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé. Rapport Office Parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques (Dir.). Rapport Sénat n°26: 360.
- Monteiro C M; Castro P.M.L; Malcata F.X; (2012). Metal uptake by microalgae: underlying mechanisms and practical applications. *Biotechnology progress*, 28(2), 299–311.
- [Moon, R J.](#); [Martini A](#); [Nairn J](#); [Simonsen J](#) et [Youngblood J](#). (2011). [Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites](#) .*Journal of Cellulose*. 40(7):3941-94.
- Morelli E et Scarano G. (2001) . Synthesis and stability of phytochelatins induced by cadmium and lead in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Marin Environmental Research* .52: 383-395.
- [Morice G](#) ; [Jamma C](#). (1992). De l'or vert à la tonne. *Science et Vie* 894: 96-99.
- Mulbry W., Kondrad S., Pizarro C., Kebede-Westhead E. (2008). Treatment of dairy manure effluent using freshwater algae: algal productivity and recovery of manure nutrients using pilot-scale algal turf scrubbers. *Bioresource technology*, 99(17), 8137–42.
- Muller-feuga A; Moal J; Kaas R; (2003). The aquaculture of microalgae. In L.A. McEvoy & J.G. Stottrup (Ed.), *Live feeds in marine aquaculture* (pp. 206–252). London, UK: Wiley-Blackwell.
- Murphy L S et Belastock R A. (1980). The effects of environmental origin on the response of marine diatoms to chemical stress. *Limnology. Oceanography*. 25: 160-165.

- Nagata T. (2000). Production mechanisms of dissolved organic matter, p. 121–152. In D. L. Kirchman [ed.], Microbial ecology of the oceans. John Wiley.
- Nardella A; Chaubet F; Boisson-Vidal C; Blondin C; Durand P; and Jozefonvicz J. (1996) .Anticoagulant low molecular weight fucans produced by radical process and ion exchange chromatography of high molecular weight fucans extracted from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. Carbohydrate Research 289:201–208.
- Nassiri, Y; Mansat J L; Wéry J ; Ginsburger-Yogel T et Amiard J C. (1997). «Ultrastructural and electron energy loss spectroscopy studies of sequestration mechanisms of Cd and Cu in the marine diatom *Skeletonema costatum*». Archives of environmental contamination and toxicology, vol. 33 , no 2, p. 147-155.
- Nelson ML ;O'Connor RT .(1964) Relation of certain infrared bands to cellulose crystallinity and crystal lattice type. Part II: a new infrared ratio for estimation of crystallinity in cellulose I and II. Journal of applied polymers Science 8(3): 1328-1341
- Oh SY; Yoo DI; Shin Y; Seo G (2005) . FTIR analysis of celluloses treated with sodium hydroxide and carbon dioxide. Journal of Carbohydrate Research 340: 417-428.
- Pal R; et Rai J P N. (2010) . Phytochelatin: peptides involved in heavy metal detoxification. Applied Biochemistry and Biotechnology, vol. 160, no 3, p. 945-963
- Pal D ; Khozin-Goldberg I; Cohen Z; Boussiba S .(2011). The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. Applied Microbiology and Biotechnology 90:1429-1441..
- Pal D; Khozin-Goldberg I; Didi-Cohen S; Solovchenko A; Batushanky A, Kaye Y, Sikron N; T Samani; A Faut & S Boussiba. (2013) . Growth, lipid production and metabolic adjustments in the euryhaline euglenoid stigmatophyte *Nannochloropsis oceanica* CCALA 804 in response to osmotic downshift. Applied Microbiology Biotechnology 97: 8291-8306.
- Pawlik-Skowronska B. (2001). Phytochelatin production in freshwater algae *Stigeoclonium* in response to heavy metals contained in mining water; effects of some environmental factors. J Aquatic Toxicology. 52: 241-249.
- Payen A. (1838) .Mémoire sur la composition du tissu propre des plantes et du ligneux. C R Hebd Seances Academic Science 7: 1052–1056
- Pelmont J ; (2008). Glossaire de biochimie environnementale. EDP SCIENCES.
- Peng H; Wang N ; Hu Z.R; Yu Z P; Liu Y H; Zhang J S et Ruan R. (2012). “Physicochemical characterization of hemicelluloses from bamboo (*Phyllostachys pubescens* Mazel) stem, Industrial Crops and Products 37(1),41-50.

- Percival, E; (1979). The polysaccharides of green, red and brown seaweeds: their basic structure, biosynthesis and function. *British Phycological Journal*. 14,103-117.
- Person J .(2011). Algues, filières du futur. Livre turquoise. 2011. Algues, filière du futur. Éditions Adebiotech. 164p.
- Piscator M. (1964). On cadmium in normal human kidneys with a report on the isolation of metallothionein from cadmium exposed rabbit livers. *Nord Hyg. Tidskr.* 45: 76-82.
- Pistocchi R ; Guerrini F ; Balboni V et Boni ; L.(1997). Copper toxicity and carbohydrate production in the microalgae *Cylindrotheca fusiformis* and *Gymnodinium* sp. *Eur. Journal. Phycology* , 32: 125–132.
- Poirier I., Jean N., Guary J.C. et Bertrand M. 2009. Robustness to cell disruption of heavy metal-resistant *Pseudomonas fluorescens* BA3SM1 isolates. *Environ. Eng. Sci.* 26: 1451-1457.
- Ponce A.G ; Fritz R ; De Ivalle C ; Etroura S.I. (2003) .Fucoidan from the brown seaweed *Adenocystis ultricularis* : extraction methods, antiviral activity and structural studies.*carbohydrate Research* 338 :153-165.
- Rauser W E. (1995) . Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis and function. *Plant Physiology*. 109: 1141-1149.
- Raven H; Peter ;Ray F;Evert ;Susan E; Eichhorn (2000). "Biologie végétale (6e édition)". DeBoeck Université, 944 p.
- Redfield A. (1934). On the proportions of organic derivatives in sea water and their relation to the composition of plankton. In Daniel, R.J. (ed James Johnstone Memorial Volume). University Press of Liverpool, 177–192.
- Ribet , J. (2003).Fonctionnalisation des excipients : Application à la comprimabilité des celluloses et des saccharoses.Thèse de doctorat : Science Biologie Santé . Limoges : Université de Limoges,235p.
- Ridame C. (2001) . Rôle des apports atmosphériques d'origines continentales dans la biogéochimie marine. Impact des apports sahariens sur la production primaire en Méditerranée. Thèse Université Paris VI, 246 pp.
- Rodolfi L ; Casini D; Prussi M; Chiaramonti D et Tredici MR . (2012). Oil production by the marine microalgae *Nannochloropsis* sp. F&M-M24 and *Tetraselmis suecica* F&M-M33. *Bioresource Technology* 114: 567-672.
- Rodolfi L; Chini-Zittelli G; Bassi N; Padovani G ; Biondi N ;Bonini G ; Tredici M. (2009). Microalgae for oil : strain selection,induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low cost photobioreactor. *Jof Biotechnology and bioengineering* 102:100-112.
- Rodolphi L .(2008). Microalgae for Oil: Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and OutdoorMass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor. *Journal of biotechnology .Bioengineering*102(1):100-113.
- Roger O. 2002. Etude d'oligosaccharides bioactifs issus d'exopolysaccharides bactériens : obtention, caractérisation et relation structure/fonction. Thèse de doctorat de l'université Paris13.

- Roy C. (2002): Etude de mélanges de cellulose dans des solutions aqueuses de soude, Thèse de doctorat, Ecole Nationale Supérieure des Mines de Paris, Sophia Antipolis, France.

- Sánchez Mirón A; Cerón García M-C; Contreras Gómez A; García Camacho F; Molina Grima E; Chisti Y. (2003). Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. Biochemical Engineering Journal; 16:287–97.

- Sarkanen K et Ludwig C. (1971). Definition and nomenclature. Dans: Lignins: Occurrence, formation, structure and reaction. Eds. K.V. Sarkanen, C.H. Ludwig. Ch1. Wiley interscience

- Scheller HV, Ulvskov P (2010) *Hemicelluloses*. Annual Review of Plant Biology. 61: 263–289.

- Scholz M J; Weiss T L; Jinkerson R E; Jing J; Roth R; Goodenough U; Posewitz MC; Gerken HG. (2014) Ultrastructure and composition of the *Nannochloropsis gaditana* cell wall. *Eukaryot Cell*. Nov; 13(11):1450-64.

- Sforza E; A Bertucco; T Morosinotto et Giacometti G. (2012). Photobioreactor for microalga growth and oil production with *Nannochloropsis salina* from lab-scale design. *Chemical engineering Research and design* 90:1151-1158

- Sharma Naveen Kumar; Rai A.K. (2011). Biodiversity and biogeography of microalgae. *Progress and pitfalls*. 15: 1–15.

- Shawn R Starkenburg; Kyungyoon J Kwon; Ramesh K Jha; Cedar McKay; Michael Jacobs; Olga Chertkov; Scott Twary; Gabrielle Rocap; Rose Ann Cattolico. (2014) A pangenomic analysis of the *Nannochloropsis* organellar genomes reveals novel genetic variations in key metabolic genes. *BMC Genomics* 15:212.

- Shawn R Starkenburg; Kyungyoon J Kwon; Ramesh K Jha; Cedar McKay; Michael Jacobs; Olga Chertkov; Scott Twary, Gabrielle Rocap; Rose Ann Cattolico. (2014). A pangenomic analysis of the *Nannochloropsis* organellar genomes reveals novel genetic variations in key metabolic genes. *BMC Genomics* 15:212.

- Sialve B., Bernet N., Bernard O. (2009). Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology advances*, 27(4), 409–416.

- Simionato D; MA Block; N La Rocca; J Jouhet; E Meréchal; G Finazzi & T Morosinotto. (2013). The response of *Nannochloropsis gaditana* to nitrogen starvation includes de novo biosynthesis of triacylglycerols, a decrease of chloroplast galactolipids, and reorganization of the photosynthetic apparatus. *Eukaryot Cell* 12: 665-676.

- Simionato D; E Sforza; E Corteggiani; A Carpinelli-Bertucco; GM Giacometti & T Morosinotto. (2011). Acclimation of *Nannochloropsis gaditana* to different illumination regimes: Effects on lipids accumulation. *Bioresource Technology* 102: 6026-6032.

- Smit B; Pilifosova O; (2003). From adaptation to adaptive capacity and vulnerability reduction. In: Smith, J.B., Klein, R.J.T., Huq, S. (Eds.), Climate Change, Adaptive Capacity and Development. Imperial College Press, London.
- Solovchenko A; Lukyanov A; Solovchenko O; Dihi-Cohen S , Boussib B & I K hozin -Goldberg . (20 14) Interactive effects of salinity, high light, and nitrogenstarvation of fatty acid an d caroten oids profiles in *Nannochloropsis oceanic* CCALA 804. *European Journal of Lipid Science Technology* 116: 635-644.
- Spijkerman E; Barua D; Gerloff-Eii A; Kern J ;Gaedke U; Heckathorn U S . (2007) . Stress responses and metal tolerance of *Chlamydomonas acidophila* in metal-enriched lake water and artificial medium. *Extremophiles*, 11:551-562.
- Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineerin* 2006;101:87–96.
- Stauber J L et Florence T M. (1987). Mechanism of toxicity of ionic copper and copper complexes to algae. *Marine Biology* . 94: 511- 519.
- Stevenson R J., Bothwell ML and Lowe R L., (1996). *Algal Ecology:Freshwater Benthic Ecosystems* .Academic Press, San Diego.
- Stone a ;Derek J; Melton Lewis S . (1998). Structure-function relations of heparin-mimetic sulfated xylan oligosaccharides: inhibition of Human Immunodeficiency Virus-1 infectivity in vitro. *Glycoconjugate journal* 15 :697-712.
- Suda S ; Atsumi M ; Miyashita H . (2002) .Taxonomic characterization of a marine *Nannochloropsis* species, *N. oceanica* sp. nov. (Eustigmatophyceae). *Phycologia* 41: 273-279.
- Suda S; Atsumi M et Miyashita H. (2002). Taxonomic characterization of a marine *Nannochloropsis* species, *N. oceanica* sp. nov. (Eustigmatophyceae). *Phycologia* 41: 273279.
- Sun Z Y; Tang Y. Q; Iwanaga T; Sho T et Kida K. (2011). Production of fuel ethanol from bamboo by concentrated sulfuric acid hydrolysis followed by continuous ethanol fermentation. *Bioresource Technology* .102(23), 10929-10935.
- Sunda W G et Guillard R R L. (1976). The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper phytoplankton. *J. Mar. Res.* 34: 511-529.
- Thomas C ; Pourcelot Y.(1993). Preformulation of five commercial celluloses in drug development : Rheological and mechanical 477 ehavior .*Drug. Drug Development and Industrial Pharmacy*19(15),1947.
- Thomas W.A., Dodson A.N et Reid F.M.H. (1978). Diatom productivity compared to other algae in natural marine phytoplankton assemblages. *Journal Phycology* . 14: 250-253.
- Tiainen, E; Drakenberg T; Tamminen T; Kataja K; Hase A.(1999) Determination of phenolic hydroxyl groups in lignin by combined use of¹H NMR and UV spectroscopy. *Holzforschung*53:529–583.

- Tripathi BN; Gaur JP .(2006). Physiological behaviour of *Scenedesmus* sp. during exposure to elevated levels of Cu and Zn and after withdrawal of metal stress. *Protoplasma* 229:1–9
- Van Den Hende S; Vervaeren H; Boon N; (2012). Flue gas compounds and microalgae: (bio)chemical interactions leading to biotechnological opportunities. *Biotechnology advances*. 30(6):1405-24.
- Van Vooren G F ; Legrand J; Legrand S ; Cuiné G ; Peltier et Pruvost J. (2012) . Investigation of fatty acids accumulation in *Nannochloropsis oculata* for biodiesel application. *Bioresource Technology* 124: 421-432
- Vasconcelos M T S D et Leal M F C. (2001). Seasonal variability in the kinetics of Cu, Pb, Cd and Hg accumulation by macroalgae. *Marine Chemistry* . 74: 65-85.
- Vasconcelos MTSD et Leal MFC (2001). Seasonal variability in the kinetics of Cu, Pb, Cd and Hg accumulation by macroalgae. *Marine Chemistry*. 74: 65-85.
- Viarengo A ; Pertica M ; Canesi L ; Mazzucotelli A ; Orunesu M et Bouqueneau JM.(1989). Purification and biochemical characterization of a lysosomal copper-rich thionein like protein involved in metal detoxification in the digestive gland of mussels. *Comp. Biochem. Phys. Part C: Comp. Pharmacology* . 2: 389-395.
- Vieler A; Wu G; Tsai C-H; Bullard B; Cornich AJ; C Harvey; Reca I-B, Thornburg C; Achawanantakun R; Buehl CJ; Campbell MS; Cavalier D; Childs KL; Clarck TJ ; Deshpande R; Erickson E; Ferguson AA; Handee W; Kong Q; Li X; Lui B; Lundback S; Peng C; Roston RL; Sanjaya; Simpson JP; Terbuch A; Warakanont J; Zäuner C; Farre EM; Hegg EL ; Jiang N; Kuo M-H; Lu Y; KK Niyogi; Ohlrogge J; Osteryoung KW; Shachar Hill Y; Sear BB; Sun Y; Takahashi H; Yandell M; Shiu M-H et Benning C. (2012). Genome, functional and genannotation and nuclear transformation of the heterokont oleaginous alga *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779. *PLOS Genetics* 8: 1-25.
- Visviki I et J.W. Rachlin. (1994) . Acute and chronic exposure of *Dunaliella salina* and *Chlamydomonas bullosa* to copper and cadmium: effects on ultrastructure. *Archives of environmental contamination and toxicology*. 26: 154-162.
- Vonshak A. 1(986). Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. In R. A. (Ed.), *Handbook of microalgal mass culture* (pp. 117–145). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Wade A and Weller P J .(1994). *Handbook of pharmaceutical excipients*, Second Edition , The pharmaceutical Press, London
- Wang D, Ning K, Li J, Hu J, Han D, Wang D, Wang H, Zeng X, Jing X, Zhou Q, Su X, Chang X, Wang A, Wang W, Jia J, Wei L, Xin Y, Qiao Y, Huang R, Chen J, Han B, Yoon K, Hill RT , Zohar Y, Chen F, Hu Q & Xu J.(2014). *Nannochloropsis* genomes reveal evolution of microalgal oleaginous traits. *PLOS Genetics* 10: 1-13.

- Wertz JL. (2011). Les hemicelluloses , Document ValBiom-Gembloux Agro-Bio tech , Université de Liège,16p.
- Willstatter R; Zechmeister L; Zur kenntnisder (1913) hydrolyse von cellulose. I.Br. ,46,2401-2412.
- Winston R et Goldberg S.(2003) .Methods and compositions for helping the body resist the effects of the aging process. Brevet N°WO2002100329 A3.
- Xue H.B., Stumm W. et Sigg L. 1988. The binding of heavy metals to algal surfaces. Water Research . 22: 917-926.
- Yang H ;Yan R; Chen H; Dong H L; Zheng C.(2007) .Characteristics of hemicelluloses , cellulose and lignin pyrolysis. Fuel. 86 :1781–1788
- Yongxue Chi et Yasuyuki Takiguchi. (2015). Comparison of the Growth Performance of *Nannochloropsis oceanica* IMET1 and *Nannochloropsis gaditana* CCMP526 under Various Culture Conditions .Journal of Plant Sciences .Vol. 3, pp. 9-13.
- Yue X; Chen F; and Zhou X .(2012). Synthesis of ligning MMA and the utilization of the copolymer in PVC/wood composites. Journal of Macromoleculs Science 51(2): 242
- Zerhouni R A ; Bouya D ; Ronneau C ; Cara J. (2004). Phosphate, nitrogen, chromium and cadmium uptake by three green algae species isolated from an urban wastewater. Revue science des sciences de l'eau 17/3:317-328.

غناها في الدهون يجعلها مرشحا رئيسيا لانتاج وقود ديزال الحيوي. عملنا على هذا الطحلب راجع على بوليمار ذات قيمة تجارية عالية موجودة في الجدار الخلوي: السليلوز. يشكل هذا السكر 25 % من المادة الجافة; استخلاصه بطرق بسيطة يسمح بالحصول على بوليمار خال من اللجنين ووجود كمية ضئيلة من الأحماض الدهنية الجدارية. مما يجعل هذه السليلوز بديلا للسليلوز النباتية في عديد الاستعمالات. إنتاج جسيمات السليلوز متناهية الصغر يسمح بالحصول على هياكل لديها خصائص متميزة لصنع الأدوية. تكسب قدرة عالية على امتصاص المعادن الثقيلة نحصل على 65 % من نموها في تركيز 50 PPM من الكاديوم ' بينما طحالب أخرى لا تستطيع النمو في 2 % من الكاديوم مثل أعظم الخلايا الحية.

Nannochloropsis gaditana مرشح جدي في المعالجة البيولوجية

كلمات البحث: الطحلب ' السليلوز ' الهيميسلولز ' المعالجة Nannochloropsis gaditana البيولوجي

Résumé

Nannochloropsis gaditana est une microalgue de la famille des eustigmatophyceae. Sa richesse en lipides fait d'elle un candidat de choix pour la production de biodiesel. Notre intérêt pour cette microalgue porte sur un polymère de grande valeur ajoutée constitutif de la paroi microalgale: la cellulose.

Ce polysaccharide constitue 25 % de la matière sèche de *N.gaditana*. Son extraction par procédé simple permet d'obtenir un polymère indemne de lignine, et très peu contaminé par des acides gras pariétaux. Cette cellulose peut sérieusement se substituer à la cellulose végétale dans diverses applications.

La production de nanoparticules à partir de cellulose de *N.gaditana* permet d'obtenir des structures ayant des propriétés pour un usage pharmaceutique.

Nannochloropsis gaditana a un grand pouvoir de biosorption de métaux lourds.

Elle peut croître à 65% de son pouvoir de croissance à une concentration de 50ppm de cadmium, alors que 2 ppm de cet ion sont létales pour beaucoup de cellules vivantes.

Nannochloropsis gaditana est un candidat sérieux pour la bioremédiation.

Mots clés : microalgues, *Nannochloropsis sp.*, cellulose, hemicellulose, bioremédiation, métaux lourds.

Abstract

Nannochloropsis gaditana microalgae are a family of Eustigmatophyceae. Its richness in lipids makes it a prime candidate for biodiesel production. Our interest in microalgae is a polymer of high constitutive value of microalgale wall: cellulose.

This polysaccharide constitutes 25% of the dry matter *N.gaditana*. His mere extraction process produces a polymer uncontaminated by lignin and very few contaminated with parietal fatty acids. This cellulose can be seriously replaced by cellulose plant in various applications.

Nanoparticle production from cellulose *N.gaditana* allows obtaining structures having properties for pharmaceutical use.

Nannochloropsis gaditana has great biosorption of heavy metals.

It can grow to 65% of its growing power to a cadmium concentration of 50 ppm, and 2 ppm of this ion is lethal to many living cells. *Nannochloropsis gaditana* is a serious candidate for bioremediation.

Keywords: microalgae, *Nannochloropsis sp.*, Cellulose, hemicellulose, bioremediation, heavy metals.

Résumé

Nannochloropsis gaditana est une microalgue de la famille des eustigmatophyceae. Sa richesse en lipides fait d'elle un candidat de choix pour la production de biodiesel. Notre intérêt pour cette microalgue porte sur un polymère de grande valeur ajoutée constitutif de la paroi microalgale: la cellulose. Ce polysaccharide constitue 25 % de la matière sèche de *N.gaditana*. Son extraction par procédé simple permet d'obtenir un polymère indemne de lignine, et très peu contaminé par des acides gras pariétaux. Cette cellulose peut sérieusement se substituer à la cellulose végétale dans diverses applications. La production de nanoparticules à partir de cellulose de *N.gaditana* permet d'obtenir des structures ayant des propriétés pour un usage pharmaceutique. *Nannochloropsis gaditana* a un grand pouvoir de biosorption de métaux lourds. Elle peut croître à 65% de son pouvoir de croissance à une concentration de 50ppm de cadmium, alors que 2 ppm de cet ion sont létales pour beaucoup de cellules vivantes. *Nannochloropsis gaditana* est un candidat sérieux pour la bioremédiation.

Mots clés :

Microalgues; *Nannochloropsis sp.*; cellulose; Hemicellulose; Bioremediation; Métaux lourds; Holocellulose; Extraction; Caractérisation; Algues.