

## TABLE DES MATIÈRES

Dédicaces.....	ii
Remerciements.....	iii
Résumé.....	iv
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Listes des acronymes et abréviations.....	xiv
<b>Chapitre I. Introduction Générale, Problématique et Objectifs.....</b>	<b>1</b>
1.1 Introduction.....	2
1.2 Les microalgues.....	3
1.3 Généralités sur les lipides.....	7
1.3.1 Les triglycérides ou triacylglycérols.....	7
1.3.2 Les stérols.....	8
1.3.3 Les phospholipides.....	9
1.3.4 Les acides gras.....	10
1.4 Les lipides chez les microalgues.....	11
1.5 Problématique.....	12
1.5.1 Techniques de production des microalgues en écloséries.....	13
1.5.1.1 Culture en sacs et en cylindres.....	14
1.5.1.2 Culture en bassins extérieurs.....	17

1.5.2 Succès des opérations d'écloserie.....	18
1.5.2.1 Qualité des eaux.....	18
1.5.2.2 Qualité des œufs.....	19
1.5.2.3 Qualité nutritionnelle.....	20
1.5.2.4 Les maladies.....	21
1.5.3 Pourquoi choisir les producteurs de microalgues ?.....	22
1.5.3.1 Considérations techniques.....	22
1.5.3.2 Considérations économiques.....	24
1.6 Objectifs.....	25

## **Chapitre II. Preservation of lipid content in microalgae concentrates by**

<b>ultrafiltration.....</b>	<b>27</b>
Abstract.....	28
2.1. Introduction.....	29
2.2 Materiel and method.....	30
2.2.1 Microalgal culture.....	30
2.2.2 Experimental design.....	31
2.2.3 Lipid and dry weight analysis.....	32
2.2.4 Analysis of viability.....	34
2.2.5 Data analysis.....	35
2.3 Results.....	35
2.3.1 Effect of preservative.....	35

2.3.2 Effect of storage time.....	39
2.3.3 Viability of microalgal cells in concentrates.....	43
2.4 Discussion.....	45
2.5 Conclusion.....	47
<b>Chapitre III. Enrichissement des microalgues en acides gras polyinsaturés pour les besoins de l'aquaculture.....</b>	<b>48</b>
Résumé du chapitre.....	49
3.1 Introduction.....	50
3.2 Matériel et Méthode.....	53
3.2.1 Stress nutritionnel.....	56
3.2.2 Échantillonnage.....	59
3.2.3 Analyses chimiques.....	60
3.2.4 Analyse statistique.....	62
3.3 Résultats.....	62
3.3.1 Étude comparative de deux sites.....	62
3.3.2 Production d'astaxanthine à Pointe-au-Père.....	66
3.3.3 Enrichissement de deux espèces de diatomées.....	66
3.3.3.1 Grandes classes de lipides.....	67
3.3.3.1.1 Effet du traitement.....	67
3.3.3.1.2 Effet du temps.....	67
3.3.3.2 Acides gras.....	69

3.3.3.2.1 Effet du détaillé temps.....	71
3.4 Discussion.....	74
3.4.1 Influence du site géographique.....	74
3.4.2 Production d’astaxanthine.....	74
3.4.3 Stress nutritionnel.....	75
<b>Chapitre IV. Discussion et Conclusion générales.....</b>	<b>79</b>
4.1 Discussion générale.....	80
4.2 Conclusion générale.....	82
Références bibliographiques.....	84
Annexes.....	97

**LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1.1 : Classification des microalgues eucaryotes les plus fréquemment utilisées en aquaculture.....	5
Tableau 2.1: Mean percentage ( $\pm$ SD) of fatty acids in concentrates of <i>Nannochloropsis occulata</i> according to treatment.....	38
Tableau 2.2: Mean percentage ( $\pm$ SD) of fatty acids in concentrates of <i>Isochrysis galbana</i> , <i>Pavlova lutherii</i> and the mixture of <i>Isochrysis galbana</i> , <i>Pavlova lutherii</i> and <i>Nannochloropsis occulata</i> (Mix).....	42
Tableau 3.1: Pourcentage moyen en acides gras $\pm$ écarts-types de <i>Chaetoceros gracilis</i> et <i>Thalassiosira pseudonana</i> lors du stress.....	70

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Place des microalgues dans la chaîne alimentaire aquatique.....	6
Figure 1.2 : Structure chimique du cholestérol.....	8
Figure 1.3 : Structure de la membrane cellulaire.....	10
Figure 1.4 : Réservoir rectangulaire avec éclairage supérieur pour la culture en masse de microalgues.....	14
Figure 1.5 : Photobioréacteurs en sacs.....	16
Figure 1.6 : Photobioréacteurs en sacs horizontaux.....	16
Figure 1.7 : Survie post-stress de la daurade en fonction de la teneur en acide arachidonique (AA).....	21
Figure 2.1: Concentrate versus fresh algae.....	32
Figure 2.2: Mean percentage ( $\pm$ SD) of lipid classes of concentrates from <i>Nannochloropsis oculata</i> .....	36

Figure 2.3: Temporal changes in the profile of mean percentages ( $\pm$  SD) of main essential fatty acids from mean of treatments in *Nanno* concentrates during 63-day storage at 4°C. Different letters indicate significant differences.....37

Figure 2.4: Mean percentages ( $\pm$  SD) of lipid classes for concentrates from *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutherii* and the mixture (T-iso, Mono and Nanno).....39

Figure 2.5: Temporal evolution of mean percentage ( $\pm$  SD) of main essential fatty acids (A) and sum of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids (B) in concentrates of *Isochrysis galbana* after 56-day storage at 4°C. Different letters indicate significant differences.....40

Figure 2.6: Means ( $\pm$  SD) of cell counts for Mono and T-iso at day 35 subculture.....44

Figure 2.7: Means ( $\pm$  SD) of cell counts for Nanno at day 57 subculture.....44

Figure 3.1 : *Chaetoceros gracilis*.....54

Figure 3.2 : *Thalassiosira pseudonana*.....54

Figure 3.3 : Schéma du système de culture en semi-continu (PEPPA).....55

Figure 3.4 : Inoculation des photobioréacteurs à partir d'une culture en touri de 20L.....	57
Figure 3.5 : Enrichissement des microalgues en kwalls.....	57
Figure 3.6 : Design expérimental de l'enrichissement à Grande-Rivière et à Pointe-au-Père.....	58
Figure 3.7 : Evolution de la concentration cellulaire lors de l'enrichissement de <i>Chaetoceros gracilis</i> à Grande Rivière.....	65
Figure 3.8 : Evolution de la concentration cellulaire lors de l'enrichissement de <i>Chaetoceros gracilis</i> à Pointe-au-Père.....	65
Figure 3.9 : Évolution des grandes classes de lipides exprimées en % $\pm$ écarts-types de <i>Chaetoceros gracilis</i> lors du stress.....	68
Figure 3.10 : Évolution des grandes classes de lipides exprimées en % $\pm$ écarts-types de <i>Thalassiosira pseudonana</i> lors du stress.....	68
Figure 3.11 : Évolution des principaux acides gras essentiels exprimées en % $\pm$ écarts-types de <i>Chaetoceros gracilis</i> lors du stress.....	71

Figure 3.12 : Évolution des acides gras saturés, monoinsaturés et polyinsaturés exprimées en %  $\pm$  écarts-types de *Chaetoceros gracilis* lors du stress.....72

Figure 3.13: Évolution des principaux acides gras essentiels exprimées en %  $\pm$  écarts-types de *Thalassiosira pseudonana* lors du stress.....73

Figure 3.14 : Évolution des acides gras saturés, monoinsaturés et polyinsaturés exprimées en %  $\pm$  écarts-types de *Thalassiosira pseudonana* lors du stress.....73

## LISTE DES ACRONYMES ET ABRÉVIATIONS

ABS.....	Acrylonitrile Butadiène Styène (un plastique)
AMPL.....	Aceton Mobile Polar Lipid
FAO.....	Food and Agriculture Organization
ISMER.....	Institut des Sciences de la mer
HPLC.....	Chromatographie Liquide haute Performance
HUFA.....	Acides gras hautement insaturés
KOH.....	Hydroxyde de Potassium
MeOH.....	Méthanol
MUFA.....	Acides gras monoinsaturés
PEPPA.....	Procédé à efficacité prolongée pour la production d'algues
PL.....	Phospholipides
PUFA.....	Acides gras polyinsaturés
RPM.....	Rotation Par Minute
SPE.....	Extraction en Phase Solide
ST.....	Stérol
TAG.....	Triacylglycérol
UMA.....	Unité de Masse Atomique

## CHAPITRE PREMIER

### INTRODUCTION GÉNÉRALE, PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS

## 1.1 Introduction

La baisse du niveau des captures de poissons accompagnée d'une forte demande de la population mondiale en poisson comme source de protéines animales a suscité un intérêt grandissant pour l'aquaculture. Depuis le début des années 1970, l'aquaculture a connu une croissance soutenue et sa contribution à la production alimentaire mondiale est passée de 3,9% en 1970 à 32,4% en 2004 (FAO, 2006). Selon cette même source, la plus grande part de cette croissance est attribuée aux bivalves dont les  $\frac{3}{4}$  de la production mondiale en 2000 proviennent de méthodes de cultures intensives. Les bivalves sont des organismes filtreurs qui dépendent exclusivement du plancton, dont principalement les microalgues, durant tout leur cycle de vie.

Si dans les années 1970, la production aquacole de poissons était surtout basée sur la capture et la croissance de juvéniles à partir du milieu naturel, la domestication complète de beaucoup d'espèces a été accomplie durant les vingt dernières années. Dès lors, la production de juvéniles au sein des écloséries s'est élargie à la plupart des espèces de poissons et de bivalves cultivées.

Les microalgues sont largement et diversement utilisées en aquaculture. Cependant, leur principale application demeure liée à la nutrition. Ce sont des sources essentielles de nutriments à tous les stades de croissance des mollusques bivalves (huîtres, palourdes, coquilles etc.), aux stades larvaires de quelques gastéropodes marins comme l'ormeau et au zooplancton qui sert de nourriture pour les larves de plusieurs espèces de poissons osseux et les crevettes. La production mondiale des principaux groupes d'espèces qui dépendent des microalgues, à au moins un stade de leur vie (larvaire), a atteint 7

millions de tonnes en 1997 représentant environ 20% de la production aquacole mondiale (Muller-Feuga, 2000). Du fait de leur position à la base de la chaîne alimentaire aquatique, les microalgues jouent un rôle primordial en aquaculture. À l'exception des minéraux, les espèces animales produites en aquaculture tirent tous leurs nutriments de la chaîne alimentaire. Étant donné la position des microalgues à la base de celle-ci, leurs propriétés nutritionnelles sont critiques pour la croissance et la survie des larves et des adultes (Kirk et Behrens, 1999).

## **1.2 Les Microalgues**

Les algues sont des végétaux chlorophylliens qui se développent dans l'eau ou dans les milieux très humides comme les marais. Elles font partie des végétaux inférieurs ou Thallophytes et peuplent aussi bien les mers que les milieux d'eau douce. Elles constituent la base de la chaîne alimentaire aquatique et assurent la production de ressources renouvelables jusqu'à environ 100 millions de tonnes par année à travers la pêche (Muller-Feuga, 1997). Par rapport à la taille, on distingue deux groupes : les macroalgues et les microalgues qui sont l'objet de cette étude.

Les microalgues, encore appelées algues microscopiques ou plus spécifiquement phytoplancton, ont généralement une taille de l'ordre du micron. Elles sont donc invisibles à l'œil nu. Dans le milieu aquatique, leur présence est perçue lorsqu'elles prolifèrent au point de colorer la surface des eaux. Les microalgues peuvent aussi coloniser les coques de bateaux ainsi que toutes les structures immergées comme les bouées et autres plates-formes. La présence de microalgues se manifeste aussi par des salissures provoquées sur les surfaces immergées des murs et des troncs d'arbres.

Leur coloration est due à la coexistence, dans leurs cellules, de pigments variés dont le plus important est la chlorophylle sous ses trois formes (a, b, et c). Cette chlorophylle leur confère la capacité de synthétiser la matière organique nécessaire à leur développement à partir de molécules simples comme le gaz carbonique et l'eau.

Hormis les cyanobactéries qui sont des procaryotes, le reste des microalgues est constitué par des organismes eucaryotes c'est-à-dire que leurs cellules comportent un noyau fonctionnel bien différencié. Les microalgues sont utilisées dans des domaines divers tels que l'aquaculture (Tableau 1.1), la biotechnologie, la pharmacie, la cosmétique, l'agro-alimentaire et la production d'énergie renouvelable avec le biodiesel.

Tableau 1.1 : Classification des microalgues eucaryotes les plus couramment utilisées en aquaculture

(d'après Knuckey, 1998)

Division	Classe	Ordre	Famille	Genre
Chlorophytes	Chlorophyceae	Volvocales	Polyblepharidaceae	Dunaliella
			Chlamydomonadaceae	Chlamydomonas
				Branchiomonas
				Micromonas
				Haematococcus
	Prasinophyceae	Chlorococcales	Oocystaceae	Chlorella
				Nannochloris
				Pyramimonas
			Tetraselmis*	
Chrysophytes	Prymnesiophyceae	Isochrysidales		Isochrysis*
				Dicrateria
		Pavloales		Pavlova*
	Eustigmatophyceae			Nannochloropsis
	Bacillariophyceae	Centrales	Thalassiosiraceae	Skeletonema*
				Thalassiosira*
			Chaetoceraceae	Chaetoceros*
		Pennales	Cymbellaceae	Phaeodactylum
			Bacillariaceae	Nitzschia*
			Naviculaceae	Navicula*
Cryptophytes	Cryptophyceae		Rhodomonas*	
			Cryptomonas	
			Chroomonas*	

\* Espèces les plus couramment utilisées en conchyliculture

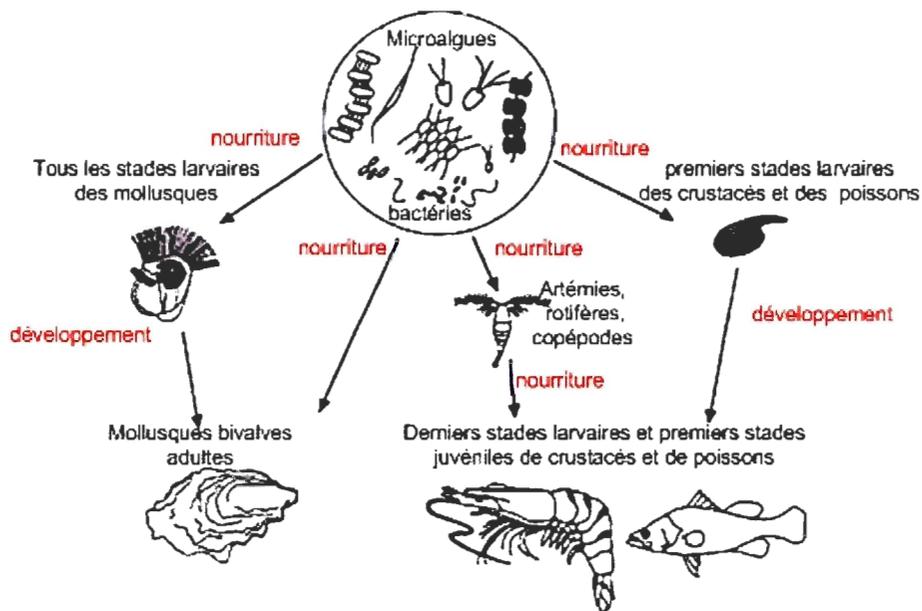


Figure 1.1 : Place des microalgues dans la chaîne alimentaire aquatique (source : Jeffrey, 2001)

Du point de vue de leur composition biochimique, les carbohydrates et les lipides constituent les principales formes de réserves énergétiques des microalgues et représentent en moyenne 10 et 15% respectivement mais varient en fonction de l'espèce et des conditions de culture (Knuckey, 1998). Cependant, d'autres constituants biochimiques telles que les protéines sont présents et peuvent atteindre des proportions de l'ordre de 40% (Pillay, 1990). Dans cette étude, nous nous focaliserons sur la fraction lipidique qui suscite actuellement beaucoup d'intérêts dans l'industrie alimentaire et la biotechnologie.

### 1.3 Généralités sur les lipides

Les lipides sont des substances d'origine biologique qui sont solubles dans les solvants organiques tels que le méthanol et le chloroforme mais peu solubles ou même totalement insolubles dans l'eau. Le groupe des lipides regroupe aussi des substances courantes comme les graisses, les huiles, certaines vitamines (A, D, K, E) et hormones, ainsi que la plupart des substances non protéiques des membranes.

Les lipides sont extraits des substances biologiques qui en sont riches, au moyen de solvants organiques (hexane, méthanol, chloroforme etc....) et leur séparation s'effectue par des techniques chromatographiques (couche mince, chromatographie en phase gazeuse, etc.).

#### 1.3.1 Les triglycérides ou triacylglycérols

Les triglycérides sont des glycérides (esters d'acides gras avec du glycérol) dans lesquels les trois groupements hydroxyles du glycérol sont estérifiés par des acides gras. Ils constituent la forme chimique sous laquelle la plupart des matières grasses des aliments ou du corps existent. Chez l'homme, ils constituent avec le cholestérol, les lipides plasmatiques. Les triglycérides sont quantitativement les plus importants parmi les lipides puisqu'ils représentent 10% du poids total chez les individus normaux du règne animal (Weil, 1990). Ce chiffre peut être plus élevé notamment en cas d'obésité. Les triglycérides constituent d'excellentes réserves d'énergie. En effet, ils sont beaucoup moins oxydés que les glucides ou les protéines et leur oxydation libère beaucoup d'énergie. Par ailleurs, ils ont des possibilités de stockage plus élevées puisque étant non polaires, ils sont stockés sous forme anhydre. En effet, cette propriété leur permet de ne pas affecter la pression osmotique. Comparés au glycogène qui se lie

à deux fois son poids avec de l'eau, ces lipides fournissent six fois plus d'énergie métabolique à poids égal (Voet and Voet, 2005).

### 1.3.2 Les stérols

Les stérols forment une catégorie importante des lipides. Leur structure est constituée par un système de quatre cycles accolés dont trois cycles à six carbones et un cycle à cinq carbones, appelé noyau multicyclique ou noyau stérol. Le plus connu des stérols est le cholestérol (Figure 1.2) qui est présent dans tous les tissus animaux mais est surtout concentré dans le cerveau et la moelle épinière. C'est le précurseur dans la biosynthèse de beaucoup d'autres stéroïdes y compris les acides biliaires et les hormones stéroïdes (Hart et Conia, 2000).

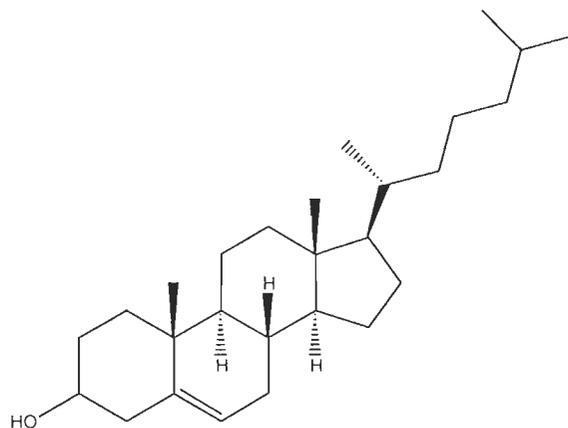


Figure 1.2 : structure chimique du cholestérol

Ils appartiennent à la fraction neutre des lipides et constituent des éléments de structure de la membrane cellulaire. Chez les microalgues, les stérols sont généralement présents à des taux relativement faibles entre 0.2 à 6.3% des lipides totaux extractibles (Volkman et al, 1989).

Cependant les diatomées, les Prymnesiophytes et les Cryptophytes semblent comporter des taux plus élevés en stérols plus particulièrement le cholestérol et ses dérivés 2,4-méthyle et éthyle (Knuckey, 1998).

### 1.3.3 Les phospholipides

Les phospholipides ou phosphatides représentent environ 40% des membranes cellulaires, les 60% restants étant constitués de protéines (Hart et Conia, 2000). Ils sont constitués d'une tête hydrophile formée d'une molécule de glycérol associée par une liaison phosphore à un groupement choline, sérine, inositol ou autres et d'une queue hydrophobe constituée de deux acides gras attachés par une liaison ester à la molécule de glycérol. Ce sont des substances largement répandues chez les animaux, les plantes et les bactéries. Ils forment la bicouche lipidique qui constitue la membrane cellulaire (Figure 1.3).

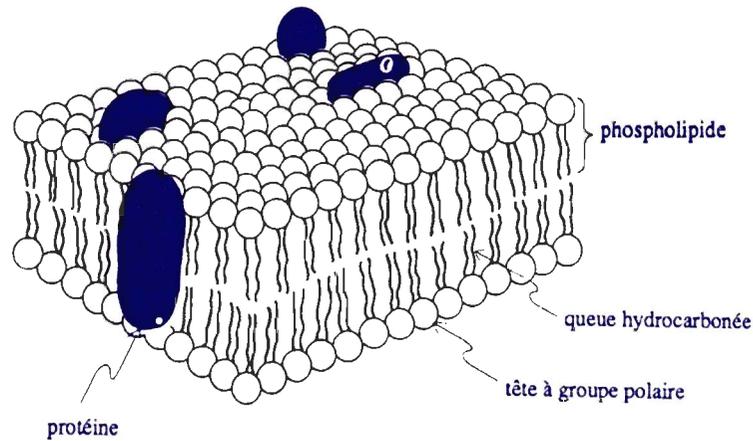


Figure 1.3 : Structure de la membrane cellulaire (Hart et Conia, 2000)

Chez les algues, les classes de phospholipides les plus répandues sont le phosphatidyl inositol, le phosphatidyl choline, le phosphatidyl glycérol, le phosphatidyl éthanolamine et le diphosphatidyl glycérol (Ben Amotz et al, 1985).

#### 1.3.4 Les acides gras

Ce sont des molécules formées d'une chaîne de carbone lié à des atomes d'hydrogène et terminée par un groupement acide (COOH). On les trouve en petites quantités à l'état libre, mais en grandes quantités engagés dans des liaisons ester. En règle générale, ce sont des acides monocarboxyliques à chaîne linéaire comprenant un nombre pair d'atomes de carbone (entre 4 et 36). Ils peuvent être saturés ou insaturés, et parfois hydroxylés ou ramifiés (Weil, 1990).

Toujours selon Weil (1990), pour les acides gras d'origine végétale, la chaîne carbonée comporte rarement plus de 18 atomes de carbone tandis que ceux qui sont d'origine animale peuvent renfermer jusqu'à plus de 30 atomes de carbone. Leur point de fusion

augmente avec la longueur de la chaîne carbonée mais cet effet diminue avec le degré d'insaturation, ce qui constitue une importante propriété pour maintenir la fluidité membranaire à basse température (Knuckey, 1998).

La composition en acides gras des microalgues dépend considérablement de leur classe. C'est ainsi que les diatomées et les prymnesiophytes ont tendance à avoir des proportions d'acides gras saturés et monoinsaturés plus élevées que celles des chlorophytes et des cryptophytes (Knuckey, 1998).

#### **1.4 Les lipides chez les microalgues**

Les lipides sont normalement retrouvés dans le cytoplasme des microalgues. Ils sont sous forme de réserves incluses dans le cytoplasme mais aussi sous forme de composés fonctionnels des membranes. Dans certains cas, ils sont excrétés sous forme de globules oléagineux dans la matrice extracellulaire des colonies de microalgues. Les acides gras constituent la plus importante composante de la fraction lipidique, comprenant entre 20 et 40 % des lipides totaux extractibles (Cohen, 1986). Le nombre de doubles liaisons peut aller jusqu'à 6. Les acides gras comportant un nombre multiple de doubles liaisons, sont dénommés acides gras polyinsaturés (PUFA) et ceux qui ont un nombre élevé d'insaturations (plus grand que 4) sont appelés acides gras hautement insaturés (HUFA).

La composition lipidique des microalgues peut dans certains cas être régulée par l'addition ou le retrait de certaines substances de leur milieu de culture. C'est ainsi que les différents stress nutritionnels (azote ou silicate) peuvent augmenter la production de lipides (Pernet et al. 2003).

### 1.5 Problématique

Les microalgues sont des végétaux unicellulaires autotrophes largement utilisées dans le domaine de l'aquaculture. Elles constituent la nourriture essentielle pour la culture des mollusques. Elles sont également utilisées pour l'alimentation du zooplancton (rotifères, artémies et copépodes) qui permet de nourrir à son tour les larves de poissons et de crustacés. Elles peuvent être utilisées seules, mais aussi comme compléments nutritionnels ou même pour la coloration de la chair des salmonidés. En outre elles servent pour la production « d'eau verte » dans les écloseries de poissons où elles joueraient un rôle dans la stabilisation de la qualité de l'eau (Okauchi et al. 1995), dans l'amélioration de l'alimentation des larves en favorisant la création de contraste visuelle (Rocha et al. 2008).

Des études ont montré l'importance de la qualité nutritionnelle dans le succès de l'élevage de larves de mollusques (Langdon et Waldock, 1981 ; Whyte et al. 1990). De plus, Webb et Chu (1983) ont démontré que parmi les constituants biochimiques du phytoplancton, les lipides jouent un rôle de première importance dans la nutrition des larves de mollusques. En outre, les acides gras polyinsaturés servent à fabriquer les phospholipides qui jouent un rôle important dans la fluidité de la membrane cellulaire qui contrôle les échanges entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule ainsi que l'activité des enzymes intra-membranaires. C'est ainsi que Pillay (1990) suggère que l'addition de phosphatidyl choline (phospholipide) dans la diète des crustacés jouerait un rôle dans le transport des lipides dans l'hémolymphe. De plus, en raison de leur qualité nutritionnelle, les acides gras polyinsaturés constituent un supplément important dans l'alimentation de bon nombre d'espèces en culture, notamment les bivalves. A ce

propos, plusieurs auteurs ont identifié les carbohydrates et les acides gras polyinsaturés (PUFA) de la classe des oméga-3 comme facteurs majeurs dans la formulation d'une bonne alimentation pour différentes espèces de bivalves (Enright et al. 1986b ; Pernet et al. 2005 et 2006 ; Soudant et al. 1998 ; Tremblay et al. 2007). Par ailleurs, la composition chimique des microalgues peut influencer les besoins nutritionnels des consommateurs (bivalves, larves de poissons ou de crustacés) étant donné que des teneurs élevées en glucides et en lipides réduisent la demande en protéines comme source d'énergie (Enright et al, 1986b ; Whyte et al, 1989).

C'est pourquoi, considérant la part prépondérante des coûts liés à la nutrition et particulièrement aux diètes protéiques dans les charges d'exploitation d'une entreprise aquacole, l'enrichissement en lipides pourrait contribuer à alléger ces charges et à augmenter la productivité.

### **1.5.1 Techniques de production des microalgues en écloséries**

La production de microalgues est une étape critique et même parfois limitante de la production aquacole. Les microalgues sont produites par diverses méthodes allant des systèmes hautement contrôlés en laboratoires aux systèmes aux rendements plus variables utilisant des réservoirs extérieurs. Les écloséries de bivalves nécessitent quotidiennement de grands volumes de cultures de microalgues de bonne qualité pour maintenir une production de juvéniles économiquement viable. Les techniques de production en écloséries sont diverses. La plupart des aquaculteurs utilisent un système en batch constitué par des sacs ou des réservoirs illuminés avec la lumière naturel ou artificielle (Figure 1.4). La plupart des structures de production utilisent l'aération pour

faciliter le mélange et l'échange gazeux, et beaucoup d'entre elles ajoutent des nutriments ainsi qu'une source de carbone ( $\text{CO}_2$ ) aux cultures (Aaron et Laidley, 2006).



Figure 1.4 : Réservoir rectangulaire avec éclairage supérieur pour la culture en masse de microalgues

Source (Helm et Bourne, 2004)

### 1.5.1.1 Culture en sacs et en cylindres

La culture en batch consiste en une seule inoculation de cellules dans un conteneur rempli d'eau de mer enrichie en sels nutritifs, suivie par une période de croissance de plusieurs jours avant la récolte qui a lieu lorsque la population algale atteint à peu près la densité maximale (Lavens et Sorgeloos, 1996). Juste avant la phase stationnaire, les microalgues sont transférées dans un plus grand bassin pour une production de masse en grand volume.

Les sacs constituent le moyen le moins dispendieux de construire des récipients pour la culture de microalgues à grande échelle. Ils sont souvent en polyéthylène et sont pour la plupart supportés par un cadre grillagé en acier ou en plastique renforcé (Figures 1.5 et 1.6). Ils peuvent être éclairés artificiellement en éclosérie ou naturellement s'ils sont installés dans une serre. En raison de leur forme cylindrique, ils comportent une meilleure productivité que les réservoirs rectangulaires. Cependant, ils ont une durée de vie relativement limitée du fait de l'accumulation de bactéries et de débris divers sur la paroi interne qui réduisent la pénétration de la lumière et causent la contamination. De surcroît, la gestion des cultures d'algues en batch varie d'une éclosérie à une autre. Par exemple, la concentration cellulaire est contrôlée de manière empirique par des techniciens qui associent les changements de couleur d'une culture aux modifications de la concentration cellulaire (Olivo, 2007).



Figure 1.5 : Photobioréacteurs en sac (source Capelle, 2008)



Figure 1.6 : Photobioréacteurs en sacs horizontaux (source Capelle, 2008)

La différence entre culture en batch et production en continu réside dans le fait que les systèmes de production en continu réduisent drastiquement les manipulations et limitent par conséquent les mauvaises pratiques et la contamination. Dans un système de production en continu, de l'eau de mer fertilisée est constamment ajoutée à la culture au moyen d'une pompe alors que l'excès de culture est simultanément enlevé. Cette méthode permet de maintenir les cultures au niveau de la phase de croissance maximale.

Entre ces deux techniques de culture, on définit la culture semi-continue qui est un système dans lequel des récoltes périodiques d'une partie de la culture sont remplacées par des volumes équivalents de milieu de culture. Elle permet d'augmenter la durée de vie ainsi que le rendement des cultures.

#### **1.5.1.2 Culture en bassins extérieurs**

De larges bassins extérieurs naturels ou en ciment, polyéthylène ou PVC ont été utilisés avec succès pour la culture de microalgues. Le milieu nutritionnel est en général constitué de fertilisants, de qualité agricole, qui stimulent une floraison incontrôlée d'algues. C'est une méthode relativement bon marché qui ne convient cependant qu'à un nombre limité de microalgues à croissance rapide en raison de problèmes récurrents liés à la contamination par les prédateurs, les parasites et d'autres espèces de microalgues non désirées (Coutteau, 1996).

De plus, cette méthode est fortement dépendante des changements météorologiques, de l'ensoleillement et de la qualité de l'eau. Même si la contamination peut être limitée dans les installations sous serre, il reste que la production est dépendante des conditions non contrôlées d'ensoleillement.

### **1.5.2 Succès des opérations d'écloserie**

Du point de vue économique, les principales variables assurant le succès de la production larvaire sont la croissance et la survie (Sahin et Ustundag, 2003). Plusieurs facteurs influençant fortement la croissance et la survie ont été rapportés dans la littérature. Parmi ceux-ci, on distingue particulièrement la qualité des eaux, la qualité des œufs, la qualité nutritionnelle et enfin les maladies.

#### **1.5.2.1 Qualité des eaux**

L'eau de mer utilisée pour la culture des microalgues doit être débarrassée de tout organisme pouvant entrer en compétition avec les microalgues, tels que d'autres espèces de phytoplancton, le zooplancton phytophage ou même les bactéries. Selon Helm et Bourne (2004), il est établi depuis longtemps que la qualité de l'eau de mer varie de manière saisonnière dans sa capacité à supporter la croissance et la survie des embryons et des larves. Ils affirment en outre que les variations de la qualité de l'eau de mer coïncident avec les floraisons de phytoplancton dans les eaux côtières au printemps. À cette occasion, la mauvaise qualité de l'eau de mer serait due aux bactéries associées aux floraisons ou aux métabolites ainsi qu'aux toxines produits par le phytoplancton. L'étude qu'ils ont menée durant six mois (de janvier à mai) a mis en évidence la variation de la qualité de l'eau de mer marquée par une détérioration progressive ainsi qu'une mortalité prononcée des larves élevées en batch au-delà du mois d'avril.

La qualité bactériologique de l'eau de mer constitue aussi un problème récurrent en ce sens que la présence de certaines bactéries pathogènes a été rapportée. C'est ainsi que dans une étude conduite dans le lagon de Bahia de la Paz au Mexique, Sainz-Hernández

et Maeda-Martínez (2005) ont révélé que la floraison de la microalgue *Mezodinium robro* constitua une importante source de nutriments pour *Vibrio sp.* Ils rapportèrent que *Vibrio sp.* était associé aux valves des copépodes qui leur servaient de niche écologique.

L'utilisation de microalgues peut aider à surmonter ce problème au niveau des écloséries comme l'ont démontré Regunathan et Wesley (2004). En effet dans leur étude, ces auteurs ont utilisé un concentré de *Tetraselmis sp.* comme supplément nutritionnel pour les géniteurs mais aussi comme une partie de la nourriture vivante des larves de la crevette *Fenneropanaeus indicus*. Ils conclurent que l'activité anti-*Vibrio* de la microalgue *Tetraselmis* réduisait considérablement le nombre de *Vibrio* dans les viscères des géniteurs, les œufs ainsi que les larves et améliorait par conséquent l'éclosion des œufs et la survie larvaire.

### 1.5.2.2 Qualité des œufs

Les organismes marins produisent un grand nombre d'œufs et par conséquent la mortalité aux premiers stades est très élevée. De ce fait, la compréhension des facteurs responsables de la mortalité précoce est cruciale pour le développement des ressources marines. Bromage et al. (1994) définissent des œufs de bonne qualité comme ceux qui sont associés à une faible mortalité durant la fécondation, l'éclosion et jusqu'aux premières prises de nourriture. Ils doivent aussi produire des stades larvaires avancés en santé et à croissance rapide même si d'autres facteurs liés aux manipulations et à l'environnement peuvent entrer en jeu.

D'autre part, des œufs de mauvaise qualité à cause des géniteurs, du stress nutritionnel, de la qualité des eaux ou bien d'un excès de mûrissement, peuvent mener à une faible survie durant les tout premiers stades ontogéniques de la plupart des espèces marines.

### 1.5.2.3 Qualité nutritionnelle

Plusieurs études se sont penchées sur les rapports entre les lipides provenant de la nourriture notamment les HUFA et la performance larvaire. C'est ainsi que selon Whyte et al. (1990), les acides gras C16:0, C18:0, C18:1n-7, C20:5n-3 et C22:6n-3 sont accumulés par les larves du pétoncle de roches *Crassadoma gigantea* indiquant un possible besoin nutritionnel de ces acides gras durant la phase larvaire. D'autres auteurs comme Enright et al. (1986), Watanabe et al. (1983) et Pernet et al. (2006) ont montré que l'acide éicosapentaénoïque (EPA) C20:5n-3 appartenant à la famille des oméga-3 ainsi que son élongation l'acide docosahexaénoïque (DHA) C22:6n-3 font partie des composés membranaires les plus importants des animaux marins et sont considérés comme des nutriments essentiels. Harel et Koven (2002) ont trouvé que l'utilisation de l'acide arachidonique (AA) comme supplément nutritionnel pour des géniteurs améliorerait sensiblement la reproduction et la qualité des œufs. Ils ont par ailleurs découvert que des larves de daurade (*Sparus aurata*) nourries avec des rotifères enrichies en AA par l'entremise de microalgues et d'autres suppléments nutritionnels, amélioreraient leur croissance et leur survie dans des conditions de stress (Figure 1.7).

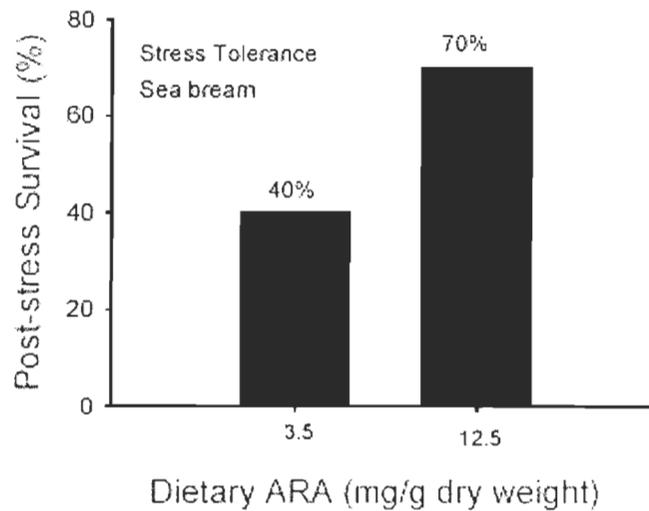


Figure 1.7 : Survie post-stress des larves de la daurade (*Sparus aurata*) en fonction de la teneur de la nourriture en acide arachidonique (source : Harel and Koven, 2002).

Dans la même veine, Pernet et Tremblay (2004) ont démontré qu'une déficience en acide arachidonique (AA) avait des effets négatifs sur les performances larvaires du pétoncle géant *Placopecten magellanicus*.

#### 1.5.2.4 Les maladies

Une des préoccupations majeures de l'industrie aquacole demeure le développement de pathogènes et de maladies qui peuvent survenir dans les écloséries et ravager la production. Sahin et Ustundag (2003) affirment que toute nourriture vivante, comme les microalgues, comporte une importante charge bactérienne qui peut causer des infections et de lourdes mortalités larvaires. Plusieurs études confirment que *Vibrio sp.* est parmi les bactéries opportunistes qui peuvent occasionner de sérieux problèmes aux écloséries (Nicolas et al., 2004 ; Croci et al., 2006). Hormis l'eau de mer, d'autres causes potentielles sont suspectées au niveau des écloséries. A cet effet, l'eau du robinet a été

identifiée comme une importante source de *Vibrio sp.* et la contamination surviendrait lors du rinçage des réservoirs après la désinfection (Sainz-Hernández et Maeda-Martínez, 2005). Beaucoup d'auteurs ont lié les questions de croissance et de santé en aquaculture à la contamination des cultures algales. À ce propos, Nicolas et al. (2004) observèrent qu'une culture d'*Isochrysis galbana* freinait la croissance des larves de la coquille (*Pecten maximus*) en raison de la présence dans la culture de la bactérie *Cytophaga sp.* Les mêmes auteurs ont rapporté que différentes bactéries peuvent facilement coloniser les cultures de microalgues. A ce niveau, il est recommandé aux écloseries de contrôler régulièrement la diversité bactérienne sur milieu solide ou de changer régulièrement de sources de microalgues.

### **1.5.3 Pourquoi choisir les producteurs de microalgues ?**

#### **1.5.3.1 Considérations techniques**

Comme mentionné plus haut, la production de microalgues en écloseries est principalement basée sur les systèmes en batch qui utilisent en général des réservoirs en fibre de verre ou en plastique et des sacs en polyéthylène. Ces systèmes ne permettent pas une production stable et les rendements sont souvent très variables. Comme l'a confirmé Borowitzka (1997), la production de microalgues requiert une expertise qu'on trouve peu en écloseries et les systèmes utilisées (réservoirs, sacs, bonbonnes) sont souvent inefficaces et conduisent à des productivités faibles et à des produits peu fiables. Par conséquent, l'utilisation de photobioréacteurs entièrement contrôlés pour la production massive de microalgues pour l'aquaculture semble susciter un grand intérêt (Tredici, 2004). Cette technologie est disponible dans les structures de production

spécialisées qui sont capables d'offrir aux écloséries des microalgues monospécifiques, sécuritaires et de haute qualité.

Dans les systèmes de photobioréacteurs à haut rendement, la qualité de l'eau de mer n'est plus un souci puisqu'elle subit des traitements efficaces avec un équipement moderne (lumière ultraviolette, ultrafiltration, osmose inverse, ozonation etc.). Le contrôle informatique et l'automatisation des procédés réduisent considérablement les manipulations et par conséquent les coûts de main-d'œuvre ainsi que les risques de contaminations afférentes. En outre, ces systèmes permettent une production en continu ou en semi-continu pour garantir l'approvisionnement régulier des écloséries. En dehors des hautes productivités qui sont atteintes, la production contrôlée en photobioréacteurs permet d'avoir des microalgues à haute valeur nutritionnelle (Borowitzka, 1997). D'autre part, ces systèmes offrent des conditions stables de culture et une reproductibilité qui permettent de réduire sensiblement les variations de la composition chimique des microalgues. Comme les conditions de culture influencent sensiblement la composition et la qualité nutritionnelle des microalgues (Pernet et al. 2003), ces systèmes entièrement contrôlés sont nécessaires pour offrir durablement une nourriture de qualité aux écloséries.

Différentes techniques de conservation (pâtes, concentrés, poudres) sont désormais disponibles pour allonger la durée de vie des microalgues et faciliter leur transport. Heasman et al. (2001) conclurent qu'au-delà des avantages économiques directs, la production centralisée de microalgues sous forme conservée offre d'autres avantages. Par exemple, elle permet de contrôler la charge bactérienne et de métabolites qui est associée aux cultures et qui est jugée dangereuse pour les larves de certains mollusques

(Watson et al., 1986) et de crustacés (Griffith et al, 1973). De plus, Nell et O'Connor (1991) ont suggéré que l'élimination du milieu de culture à travers la concentration des microalgues pourrait expliquer la bonne croissance et la survie larvaire de certaines espèces nourries à partir de ces concentrés.

### **1.5.3.2 Considérations économiques**

L'augmentation de la production aquacole a suscité un besoin de plus en plus important en nourriture à base de microalgues de qualité. Selon Duerr et al. (1998), la valeur de la production de microalgues pour la production aquacole mondiale de crevettes et de bivalves est estimée à 34 millions US\$/an. La principale contrainte à la production de microalgues pour l'aquaculture est liée aux coûts. L'étude de Borowitzka (1997) réalisée sur les écloséries australiennes a révélé qu'en moyenne, les coûts alloués à la production de microalgues représentent entre 30-40% avec un maximum de 70%. Duerr et al. (1998) ont estimé les coûts de production de microalgues dans une grande éclosérie d'huîtres américaine à 50 US\$/kg de poids sec. Ces coûts seraient beaucoup plus élevés au niveau des écloséries de plus petite taille. A cet effet, Borowitzka (1997) confirme qu'une enquête internationale menée sur la production algale dans les écloséries de bivalves a montré que les coûts variaient entre 300 et 600 US\$/kg de poids sec.

Une autre contrainte liée à la rentabilité d'une éclosérie demeure l'approvisionnement en microalgues de qualité. De ce fait, la disponibilité en tout temps de microalgues de qualité constitue un gage de succès de la production des écloséries. La production de microalgues en écloséries est principalement orientée vers les systèmes en batch. Par

conséquent, comme la main-d'œuvre représente le premier poste de dépense de la production algale, cela entraîne inexorablement l'augmentation du coût total de la production. Les coûts élevés ainsi que les risques encourus par les systèmes de production de microalgues en écloséries ont incité à la recherche et au développement de méthodes alternatives tels que les concentrés de microalgues conservés, les microalgues produites de façon hétérotrophique et séchées ainsi que les produits de substitution (Heasman et al, 2000).

La question de la survie des larves est un enjeu stratégique pour les écloséries dans la mesure où elle influe directement sur la production de juvéniles de taille commerciale. Sous ce rapport, une réduction sensible de la mortalité à travers un approvisionnement régulier de microalgues de qualité permettra sans doute de relever le niveau de performance et de compétitivité des écloséries.

### **1.6 Objectifs**

L'objectif général de cette étude est de déterminer les conditions optimales pour la stabilisation des concentrés de microalgues ainsi que pour leur enrichissement en acides gras polyinsaturés. Il s'agit d'une part de vérifier si l'ajout d'additifs et les manipulations quotidiennes ont un impact sur la stabilité des concentrés de microalgues et d'autre part de mesurer l'effet du stress en silicate et celui de la lumière sur l'enrichissement des microalgues en acides gras polyinsaturés.

Les objectifs spécifiques de ce projet comportent :

- L'identification de l'espèce de diatomée la plus appropriée à l'enrichissement en acides gras polyinsaturés (AGP) durant le stress nutritionnel.

- La détermination des conditions optimales pour la stabilisation des concentrés de microalgues et le prolongement de leur durée de vie.
- L'identification de co-produits extractibles en parallèle aux acides gras, tels que les pigments.

Les hypothèses testées sont :

- Le type de traitement des concentrés a un effet sur leur composition en acides gras polyinsaturés.
- La durée du stockage au froid a un effet sur la composition des concentrés en acides gras polyinsaturés.
- La lumière a un effet sur l'enrichissement des cultures de microalgues en acides gras polyinsaturés.
- L'effet couplé du temps et d'une privation de silicate sur l'enrichissement des cultures de microalgues en acides gras polyinsaturés.

Les travaux de cette thèse de maîtrise sont présentés en deux parties traitant d'une part, de la conservation de la composition lipidique des microalgues notamment en acides gras polyinsaturés, et d'autre part, de l'enrichissement des microalgues en acides gras polyinsaturés pour l'aquaculture. Le chapitre traitant de la conservation des lipides de microalgues est présenté sous forme d'article en anglais puisqu'il devra être soumis à la revue *Aquaculture*.

**CHAPITRE DEUX**

**PRESERVATION OF LIPID CONTENT IN MICROALGAE  
CONCENTRATES BY ULTRAFILTRATION**

RapportGratuit.com

Diadié Diouf<sup>\*</sup>1, Réjean Tremblay<sup>1</sup>, Réal Fournier<sup>1</sup> and Fabrice Pernet<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Institut des Sciences de la Mer, Université du Québec à Rimouski, 310 allées des Ursulines Rimouski, QC, Canada, G5L 3A1.

<sup>2</sup> Laboratoire Environnement Ressources en Languedoc-Roussillon, Pôle "Mer et Lagunes", Cedex Sète, IFREMER Sète, France 34203.

<sup>3</sup> Institut de Recherche sur les Zones Côtières, 232B avenue de l'Église, Shippagan, Nouveau-Brunswick, Canada, E8S 1J12.

### **Abstract**

With the use of ultrafiltration process, it has been possible to concentrate by roughly 100 times microalgal cultures from Eustigmatophyceae (*Nannochloropsis oculata*), Prymnesiophyceae (*Pavlova lutherii* and *Isochrysis galbana*) and a mixture of the latter. The purpose of this study was to assess the preservation of their lipid content during eight-week storage at 4°C. Microalgae were cultured in a semi continuous system using 260L photobioreactors. At the end of the logarithmic growth phase, each culture was harvested, concentrated by ultrafiltration and transferred in sterile polyethylene flasks. Storage was then performed using food preservatives and non treated flasks served as control. A weekly sampling was conducted to monitor the lipid content of each concentrate during experiment time. Results displayed no significant discrepancy between the preserved and control concentrates, either in lipid classes or in fatty acids profile. Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) mainly eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA) and arachidonic acid (AA) did not exhibit any significant change during the eight-week storage for all species. The overall polyunsaturated fatty acids (PUFAs) were preserved at a level of 84% for all concentrates.

## 2.1. Introduction

Because of their position at the base of the aquatic food chain, microalgae play a crucial role in aquaculture. Potential applications are diverse but they are mainly used in nutrition. In this respect, microalgae are widely used as feed during the whole life cycle of bivalve molluscs, for some crustacean and gastropod larvae and to produce green water for the rearing of some fish larvae (Brown et al. 1997, Reitan et al. 1997, Muller-Feuga 2000). On the other hand, microalgae are also used for mass production of zooplankton such as copepods, rotifers and artemias which serve as feed for larvae and juveniles of fish and crustaceans (Seychelles et al., 2008). Several studies have focused on the importance of nutritional quality in the success of larvae rearing (Langdon et Waldock, 1981; Whyte et al. 1990; Powell et al. 2002; Cahu et al. 2003). In this regard, lipids and particularly polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are considered as the most important biochemical components of the food for the larvae of many marine organisms (Reitan et al. 1993, Soudant et al. 1998, Nevejan et al. 2003, Pernet & Tremblay 2004). Lipids provided by feeding as well as their constituents, fatty acids and sterols, are of great importance for fast growing larvae by the supply of energy and necessary cellular components for membrane structure (Sargent et al. 2002). Because of the limited PUFAs and sterols synthesis capacity of larvae, these components must come from nutrition (Sargent et al. 1999, Soudant et al. 2000). Moreover, it was reported that microalgae are the main source of PUFAs and sterols in the marine environment (Volkman et al. 1989, Tremblay et al. 2007). Their nutritional properties represent a critical requirement for the growth and survival of larvae and adults, and lipids, mostly polyunsaturated fatty acids, are essential for larvae survival (Kirk & Behrens, 1999).

Microalgae production is a critical and limiting step of aquaculture industry mainly in hatchery operations. Today, the need for quality, secure and available live food, is essential for hatcheries and the guaranteed supply of live microalgae would allow them to focus on numerous, heavy and delicate tasks related to larvae and juveniles rearing. In this regard, microalgal concentrates are of great benefits in the way that they can be prepared in suitable centralised facilities and shipped to hatcheries.

Biochemical constituents of microalgae mainly lipids are highly variable depending on culture conditions and time (Pernet et al. 2003) and are subjected to degradation when non living cells are concentrated (Robert & Trintignac 1997, Heasman et al. 2000, D'Souza et al. 2002, Knuckey et al. 2006). Thus, our objective was to develop a method for concentrating and stabilizing live microalgae in order to maintain their lipid nutritional values for several weeks.

## 2.2 Materiel and method

### 2.2.1 Microalgal culture

Microalgal strains were provided by Center for Culture of Marine Phytoplankton (CCMP) at Bigelow Laboratory for Ocean Sciences (Maine, USA). Starter cultures were performed in 250 ml Erlenmeyer flasks using Guillard's (1975) F/2 culture medium. A week later, these cultures were used to inoculate 20 l carboys which in turn served to inoculate 260 l photobioreactor. Hence, two Prymnesiophyceae (*Pavlova lutherii* and *Isochrysis galbana*) and one Eustigmatophyceae (*Nannochloropsis oculata*) were cultured at the station aquacole de Pointe-au-Père (Institut des Sciences de la Mer de Rimouski, Université du Québec à Rimouski, 48° 27' N; 68° 32' W, QC,

Canada) between 2007 January and March 2007 and between 2007 October and December 2007 in photobioreactors using a semi-continuous system from Nutrocean Inc. (Rimouski, QC, Canada). The semi-continuous technique expands the life span of cultures through partial periodic harvesting immediately followed by topping up to the original volume and supplementing with nutrients to achieve the original level of enrichment.

Cell concentrations were species dependent and varied from 55 million cells/ml for *Nannochloropsis occulata* to 13 million cells/ml for *Isochrysis galbana* and *Pavlova lutherii*. Photobioreactors were illuminated continuously (24 h photoperiod) using fluorescent light of 3000-4000 lux and aerated with filtered compressed air. CO<sub>2</sub> supply for photosynthesis was regulated by a flowmeter and controlled by monitoring the pH to maintain level between 7.5 and 8.5. Seawater was pumped from the Saint Lawrence estuary at 6 m depth, filtered through gravel and 1µm filter bags before sterilization using tangential ultrafiltration through a semi permeable membrane with a 100 kDa cut-off.

### 2.2.2 Experimental design

Freshly harvested cultures were transferred in stocking tank and pumped to the ultrafiltration system. Several cycles were necessary to remove water and attain cell concentration of between 1.5 and 5 billion cells/ml (Figure 2.1) measured by an electronic counter of particles equipped with a 70 µm probe (Beckman Coulter Counter Z2, Mississauga, ON, Canada). The filtrate was drained in a siphon and concentrates were collected and dispatched in 1L flakes (polyethylene, AMPAK distribution Inc.,

Laval, QC). We firstly compared temporal stability of concentrates from *Nanno* strain with and without preservative. Preservative consisted of two food quality organic acids (ascorbic and citric acids) which lowered down the pH around 5 allowing the inhibition of potential microorganisms' development. Then temporal stability of concentrates without preservative from *T-iso* and *Mono* strains was assessed as well as a mixture of microalgae comprised of 28.3% *T-iso*, 29.8% *Mono* and 41.9% *Nanno*. Concentrates were duplicated and stored at 4°C for eight weeks. During storage, concentrates flasks were shaken and opened everyday to simulate daily use in hatchery. Each week, 100 µl of concentrate were sampled in lipid cleaned vials with 2 ml of dichloromethane:methanol (2:1 v/v) for lipid analysis and 100 µl for dry weight assessment. In addition, an aliquot was used to inoculate sub-cultures for cell viability test.



Figure 2.1: concentrate (left) vs. fresh algae (right)

### 2.2.3 Lipid and dry weight analysis

Immediately after sampling, concentrates were filtered through a 25mm mesh GF/C filter already precooked at 450°C and weighed. Filters were rinsed with a 3% solution

of ammonium formate in order to dissolve sea salts, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  before dry weight determination by drying in a heat chamber at  $70^{\circ}\text{C}$  for 24 h (Lubzens et al., 1995) followed by 24 hour storage in a desiccation chamber. Filters without ammonium formate were used for lipids analysis. Lipids were manually extracted according to Folch et al. (1957), but chloroform was substituted by dichloromethane (Chen et al. 1981), with 3 ml dichloromethane: methanol (2:1 v/v) in a Pyrex tube. The grinder was rinsed twice with 3 ml dichloromethane: methanol (2:1 v/v) and 2.25 ml of KCl (0.88%) was added for a final ratio dichloromethane: methanol: potassium chloride of 2:1:0.6 (v/v/v) which was mixed and centrifuged at 500 g for 2 minutes. Lipid fraction was transferred in clean tubes using Pasteur pipettes and the solvent was evaporated under nitrogen current. Extracted lipids were then suspended in 1 ml dichloromethane. For lipid class analysis, a  $4\mu\text{l}$  aliquot of each extract was placed on silica gel comarods S-III (Iatron Laboratories, Tokyo, Japan), separated with thin layer chromatography (TLC) using four solvents (Parrish, 1987) and lipid classes determined by Iatroscan MK6 (Iatron Laboratories, Tokyo, Japan) equipped with a flame ionization detector (FID). Chromatograms were integrated using Peak Simple software version 3.2 (SRI, Torrance, CA, USA) and lipid classes identified by standards, quantified in dry weight and expressed in relative concentration (% total lipid). Detected lipid classes included aliphatic hydrocarbons triglycerides (TAG), free fatty acids (FFA), sterols (ST), acetone mobile polar lipids (AMPL) and phospholipids (PL). For fatty acids analysis, free fatty acid methylesters (FAME) were prepared according to Lepage et Roy (1984) using a solution of 2%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in pure methanol. FAME were run on a Varian CP3900 gas chromatograph equipped with a ZB-wax fused-silica capillary column (20 m $\times$ 0.18 mm ID $\times$ 0.18  $\mu\text{m}$  film thickness; Supelco,

Bellefonte, PA, USA). Helium was used as the carrier gas (flow velocity: 1 mL min<sup>-1</sup>). FAME were injected at 250 °C at a 1 to10 split ratio. The temperature ramp was 140 °C for 0.2 min, followed by an increase of 40 °C min<sup>-1</sup> to 170 °C, followed by an increase of 4 °C min<sup>-1</sup> to 185 °C, and finally by an increase of 2 °C min<sup>-1</sup> to 230 °C. The detector was maintained at 260 °C. FAME were identified by comparison of retention times with known standards (37-component FAME Mix, PUFA-3, and menhaden oil; Supelco Bellefonte, PA, USA) and quantified with nonadecanoic acid (19:0) as an internal standard. Chromatograms were analyzed using the Galaxie Chromatography Data System (version 1.9.3.2, Varian).

#### **2.2.4 Analysis of viability**

Cell viability of microalgae concentrates during storage was assessed by carrying out sub-cultures of Nanno, T-iso and Mono at different periods along the experiment time duration. Each sample was sub-cultured axenically through an incubator at 20°C in two tubes filled with sterilised culture medium using a disposable needle. The surrounding environment was also sterilized with flame provided by a Bunsen burner. A sample of sub-cultures was weekly monitored through cell counting and microscope observations to assess cell viability. Cell viability was demonstrated after three weeks, when the cell concentration continued to grow, and then sub-cultures were stopped and discarded. Microscope observations were also used to confirm cell motility and viability.

### 2.2.5 Data analysis

Multiple variance analysis (MANOVA) was used to determine differences within lipid classes, fatty acids (EPA, DHA, AA) and also sum of fatty acids (saturated, monounsaturated and polyunsaturated). Concerning concentrates of Nanno, different lipid classes or fatty acids were considered as dependent variables whereas different treatments (with or without preservative) as well as time were considered as independent variables. Interaction between time and treatment was also determined. For concentrates from T-iso, Mono and the mixture, dependent variables were lipid classes or fatty acids and time duration was the independent variable. Residues were sorted to examine the normality according to the normal curve of probability, and tested using Kolmogorov–Smirnov. When necessary, datas were transformed using arcsinus and homogeneity of variance was tested with Levene’s test. All datas were treated through the SPSS 15.0 software for Windows (Chicago, IL, USA).

## 2.3 Results

Considering lipid classes, triglycerides (TAG), sterols (ST), acetone mobile polar lipids (AMPL) and phospholipids (PL) represented more than 94% of total lipids. Other classes such as free fatty acids did not display any significant variations with time and treatment and are not presented.

### 2.3.1 Effect of preservative

Lipid classes of concentrates from *Nannochloropsis oculata* demonstrated no effect of treatment at  $p < 0.05$  (with or without preservative) and time after 63 days of storage (Annex 1). Lipid classes of this species concentrates were composed of 20% TAG, 34%

AMPL and 35% PL (Figure 2.2). Sterols represented less than 2% of total lipids and are not presented graphically.

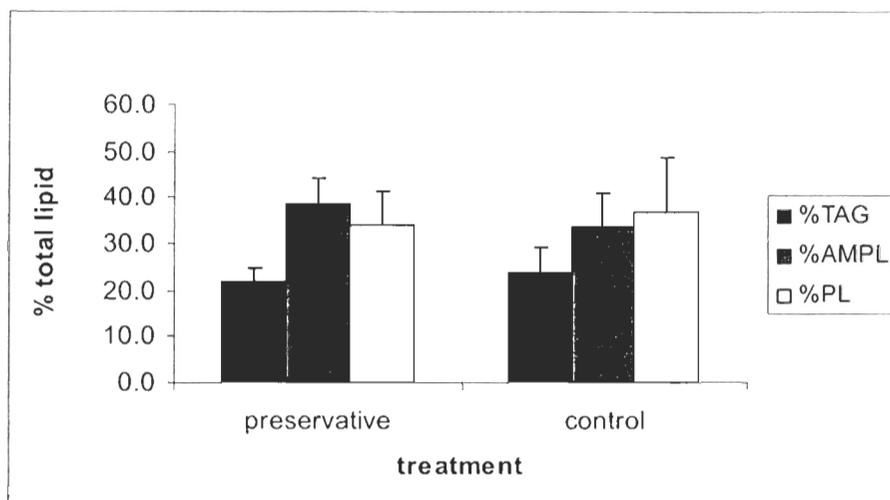


Figure 2.2: Mean percentage ( $\pm$  SD) of lipid classes of concentrates from *Nannochloropsis oculata*.

TAG: Triacylglycerol; AMPL: Acetone Mobile Polar Lipids; PL: Phospholipids.

Regarding fatty acids profile, no effect of treatment and time at  $p < 0.05$  was observed (Annex 2) for essential fatty acids (EPA, DHA, AA) and for sum of saturated, monounsaturated and polyunsaturated of Nanno concentrates. Fatty acids of *Nanno* concentrates were composed of 34% saturated, 29% of monounsaturated and 31% polyunsaturated of which 23% of EPA and 4% of AA. DHA as well as other polyunsaturated represented less than 1% (Table 2.1).

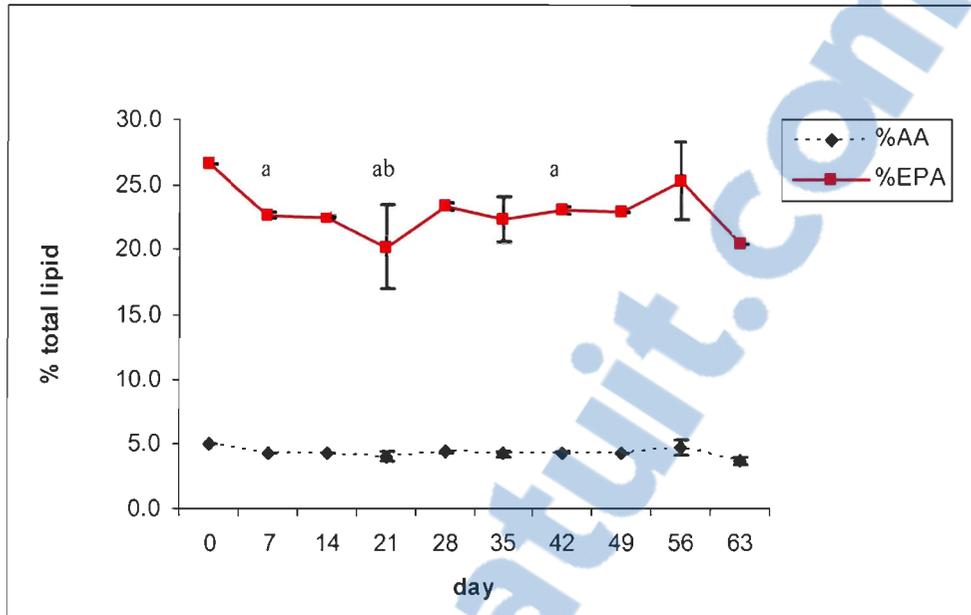


Figure 2.3: Temporal changes in the profile of mean percentage ( $\pm$  SD) of main essential fatty acids from mean of treatments in *Nannochloropsis oculata* concentrates during 63-day storage at 4°C. Different letters indicate significant differences. AA: Arachidonic acid; EPA: Eicosapentaenoic acid.

Table 2.1: Mean percentage ( $\pm$  SD) of fatty acids in concentrates of *Nannochloropsis occulata* according to treatment.

Fatty acids	<i>Nannochloropsis occulata</i>	
	preserved	control
C12:0	-	-
C14:0	6.7 $\pm$ 0.7	6.8 $\pm$ 0.5
C15:0	-	-
C16:0	26 $\pm$ 2.7	26.5 $\pm$ 2.1
C17:0	-	-
C18:0	1.6 $\pm$ 0.9	1.4 $\pm$ 0.4
C20:0	-	-
C22:0	-	-
C24:0	-	-
<b><math>\Sigma</math> saturated</b>	<b>34.3</b>	<b>34.7</b>
C16:1n-7	22.4 $\pm$ 6.2	23.2 $\pm$ 5.7
C16:1n-9	5.8 $\pm$ 1.1	5.6 $\pm$ 0.7
C20:1	-	-
C22:1n-9	0.3 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.2
<b><math>\Sigma</math> MUFA</b>	<b>28.5</b>	<b>29</b>
C18:2n-6	1.9 $\pm$ 0.2	1.9 $\pm$ 0.1
C20:2	-	-
C18:3n-6	-	-
C20:3n-3	-	-
C20:3n-6	1.4 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.1
C20:4n-6	4.3 $\pm$ 0.5	4.4 $\pm$ 0.4
C20:5n-3	22.5 $\pm$ 2.8	23 $\pm$ 2.2
C22:6n-3	0.6 $\pm$ 0.3	0.2 $\pm$ 0.1
<b><math>\Sigma</math> PUFA</b>	<b>30.7</b>	<b>30.9</b>

### 2.3.2 Effect of storage time

All lipid classes of concentrates from *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutherii* and the mixture of the latter did not demonstrate any effect of time during eight weeks of storage (Annex 3). TAG values were comprised between 10% of total lipids for *Isochrysis galbana* to 30% for the mixture. Concerning polar lipids, mean values of phospholipids were situated between 30 and 35% for all concentrates. AMPL were between 15 and 25% depending on specie and values of ST were very low for all species except *Pavlova lutherii* which sterol content represented 16% (Figure 2.4).

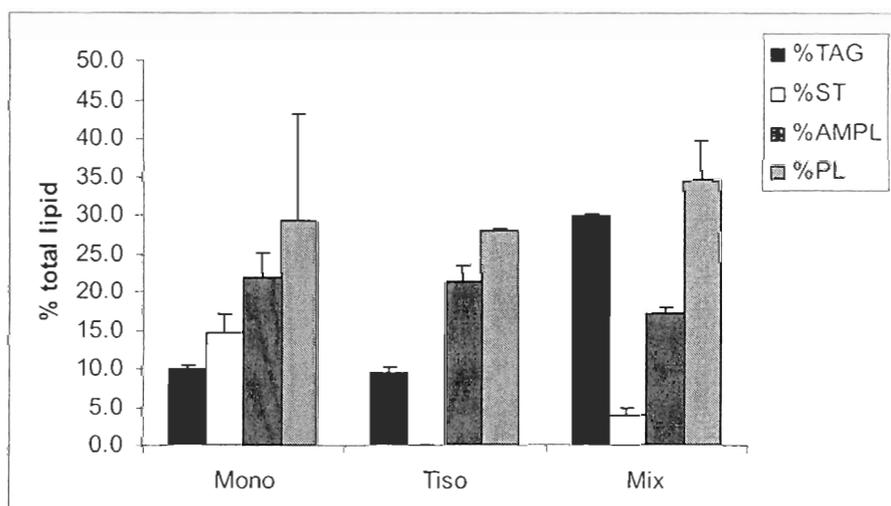


Figure 2.4: Mean percentage ( $\pm$  SD) of lipid classes in concentrates from *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutherii* and the mixture (T-iso, Mono and Nanno). TAG: Triacylglycerol; ST: Sterol; AMPL: Acetone Mobile Polar Lipids; PL: Phospholipids.

Storage time of different concentrates did not display any significant difference on essential fatty acids profile except for those of the concentrate of *Isochrysis galbana* ( $p = 0.012$ ;  $F = 1.88$ ;  $df = 48$ ; Annex 4). Decreases of about 5% for DHA ( $p < 0.05$ )

from day 35 and of 1% for EPA ( $p < 0.05$ ) from day 14 were also observed (Figure 2.5B).

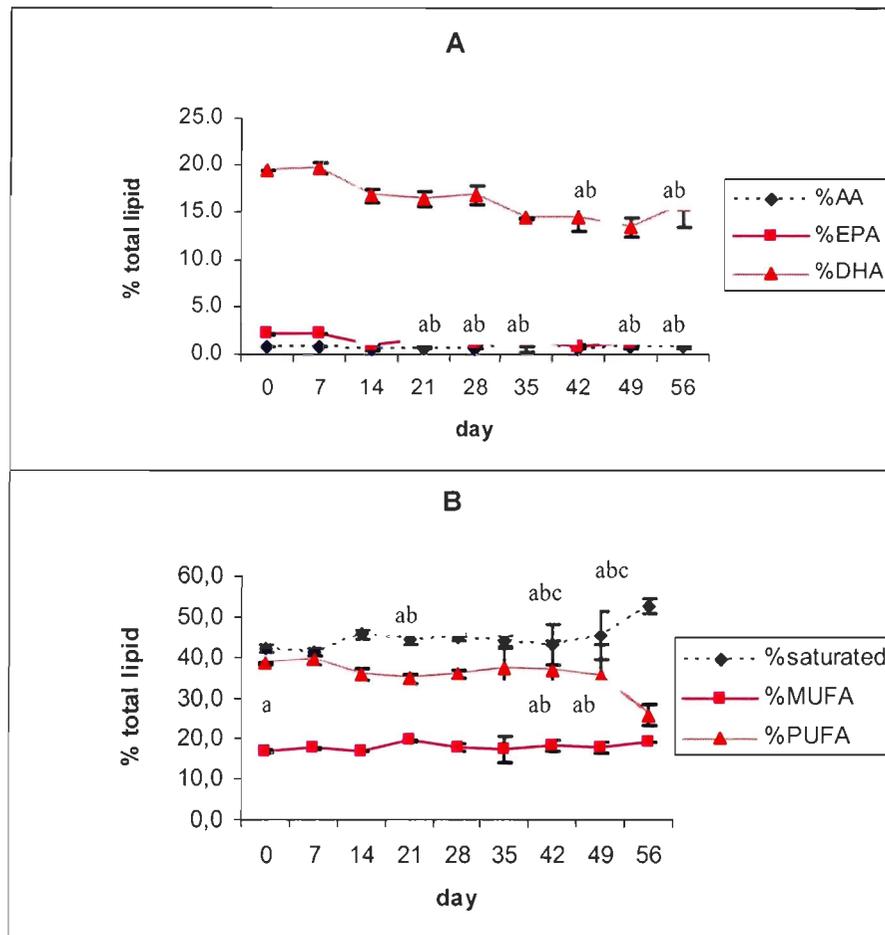


Figure 2.5: Temporal evolution of mean percentage ( $\pm$  SD) of main essential fatty acids (A) and sum of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids (B) in concentrates of *Isochrysis galbana* after 56-day storage at 4°C. Different letters indicate significant differences.

Main saturated and monounsaturated fatty acids were C14:0, C16:0, C18:0 and C16:1n-7 (Table 2.2). Depending on species, the sum of saturated varied between 31% for *Pavlova lutherii* to 45% for *Isochrysis galbana*. Monounsaturated fatty acids represented between 17% and 30% of total fatty acids of which C16:1n-7 was the most

important for Nanno, Mono and the mixture, representing more than 20% of total fatty acids of the latter (Tables 2.1 and 2.2). Regarding omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids, the main contributions were from EPA, DHA and AA. Total PUFAs in different concentrates represented roughly between 30% and 40% of total fatty acids.

Table 2.2: Mean percentage ( $\pm$  SD) of fatty acids in concentrates of *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutherii* and the mixture of *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutherii* and *Nannochloropsis occulata* (Mix).

Fatty acids	<i>Isochrysis galbana</i>	<i>Pavlova lutherii</i>	Mix
C12:0	0.8 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.3
C14:0	22 $\pm$ 3.1	9 $\pm$ 1.6	10.9 $\pm$ 0.1
C15:0	0.5 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0	0.5 $\pm$ 0.1
C16:0	17.5 $\pm$ 1.9	18.1 $\pm$ 2.4	28.9 $\pm$ 2.1
C17:0	0.6 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.2
C18:0	1.3 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 0.2	1 $\pm$ 0.2
C20:0	0.8 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.1
C22:0	1.1 $\pm$ 0.4	0.7 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1
C24:0	0.7 $\pm$ 0.4	0.5 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.3
<b><math>\Sigma</math> saturated</b>	<b>45.3</b>	<b>31.2</b>	<b>43.4</b>
C16:1n-7	4.8 $\pm$ 0.6	25.5 $\pm$ 2.5	20.1 $\pm$ 1.1
C16:1n-9	11.8 $\pm$ 1.1	4.3 $\pm$ 0.4	5.4 $\pm$ 0.5
C20:1	0.4 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1
C22:1n-9	0.6 $\pm$ 0.3	0.4 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.2
<b><math>\Sigma</math> MUFA</b>	<b>17.6</b>	<b>30.7</b>	<b>26</b>
C18:2n-6	13.3 $\pm$ 3.1	1.7 $\pm$ 0.2	4.7 $\pm$ 0.4
C20:2	0.6 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1
C18:3n-6	2.3 $\pm$ 0.9	0.6 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.3
C20:3n-3	0.7 $\pm$ 0.3	1.2 $\pm$ 1	0.9 $\pm$ 0.2
C20:3n-6	0.2 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.1
C20:4n-6	0.8 $\pm$ 0.4	2.2 $\pm$ 0.5	2.8 $\pm$ 0.2
C20:5n-3	1.5 $\pm$ 0.5	16.8 $\pm$ 4.8	13.6 $\pm$ 1.4
C22:6n-3	15.9 $\pm$ 2.4	13.7 $\pm$ 2.4	6.1 $\pm$ 0.8
<b><math>\Sigma</math> PUFA</b>	<b>35.3</b>	<b>37.1</b>	<b>29.2</b>

### 2.3.3 Viability of microalgal cells in concentrates

Sub-cultures were followed up by cell counting during three weeks and with microscope observations. We observed cell viability in concentrates of *Mono* and *T-iso* at least up to day 35 (Figure 2.6) and of *Nanno* up to day 57 (Figure 2.7).

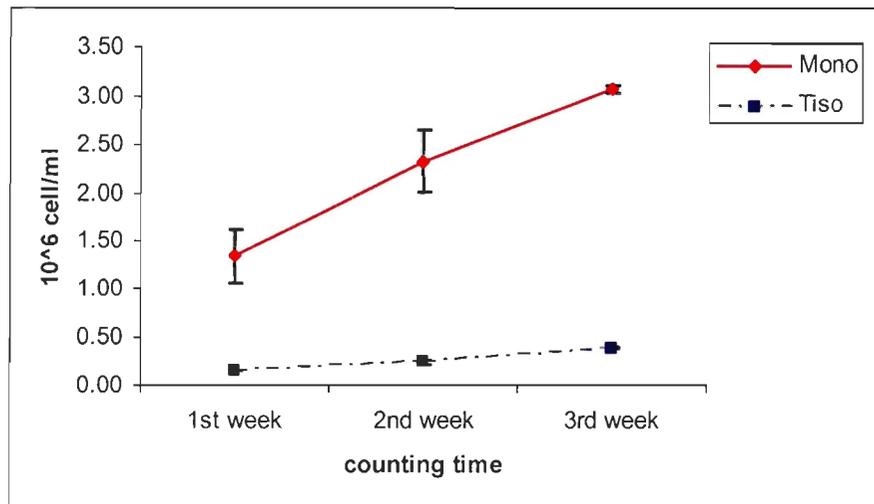


Figure 2.6: means  $\pm$  SD of cell counts for Mono and T-iso at day 35 sub-culture.

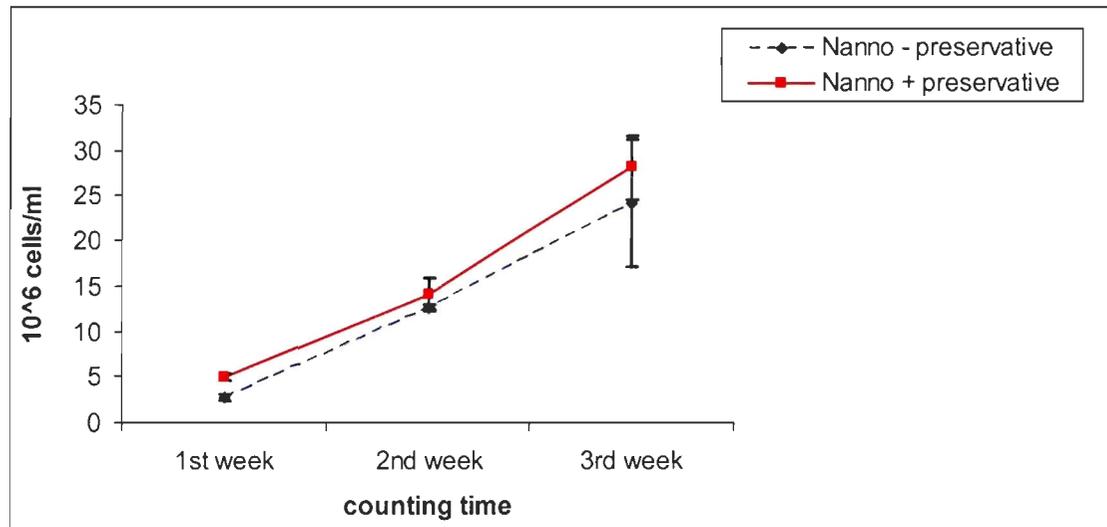


Figure 2.7: means  $\pm$  SD of cell counts for Nanno at day 57 sub-culture.

## 2.4 Discussion

Results of our study highlighted a good preservation generally without significant changes of polyunsaturated fatty acids (EPA, DHA, and AA) from microalgal highly concentrates (between 1.5 to 5 billion cells per ml) using semi continuous culture system in photobioreactors. The mean preservation rate over 56 days of essential fatty acids for all species studied was 73% for EPA, 76% for DHA and 83% for AA, which corresponded to at least  $\frac{3}{4}$  of highly unsaturated fatty acids (HUFA) that are essential to larvae and juveniles of bivalve molluscs, crustaceans and fish. Selected microalgae species are widely used as feed for larvae in hatcheries (Volkman et al. 1989, Renaud et al. 1994, Brown et al. 1997). Chemical content of microalgae mainly in polyunsaturated fatty acids is of pivotal importance for growth and survival of larvae and juveniles reared in hatcheries. According to Molina et al. (1994), nutritional value of microalgae is closely linked to their PUFAs content, mainly EPA and DHA. Accordingly, it becomes important that all preservation methods of microalgal concentrates maintain the fatty acids content. Studies on preservation of microalgal concentrates are scarce. However, some authors reported on different concentration methods such as centrifugation and flocculation. In this respect, Watson et al. (1986) reported that nutritional quality of concentrates from *Thalassiosira pseudonana* and *Chaetoceros calcitrans* made by centrifugation, decreased significantly during storage at 4°C. Moreover, Donaldson (1991) revealed that nutritional quality of microalgal paste from centrifugation rapidly depreciated during storage at 4°C. This study also showed that nutritional properties as well as cell viability were maintained only for 10 days. Our study demonstrated the ability to maintain nutritional value of microalgal concentrates realized by ultrafiltration process after a 2-month storage at 4°C. Previous studies found

this same ability as that of Molina et al. (1994) in which a concentrate of 9 g l<sup>-1</sup> from *Isochrysis galbana* stored at 4°C during 30 days maintained its polyunsaturated fatty acids content. But a significant decrease of saturated and monounsaturated fatty acids was noted as well as a cell viability of 85%. Our study concluded that HUFA preservation rate of concentrates from *Isochrysis galbana* stored at 4°C during eight weeks exceeded 80%. Cell viability was monitored by sub-cultures and microscope observation. This method demonstrated the cell viability of concentrates from Prymnesiophyceae (*Pavlova lutherii* and *Isochrysis galbana*) up to day 35 and from Eustigmatophyceae (*Nannochloropsis oculata*) up to day 57.

Our results concerning HUFA (EPA, DHA, and AA) content are similar to those found in the literature (Volkman et al. 1989, Renaud et al. 1994, Brown et al. 1997). Indeed, *Nannochloropsis oculata*, reported as an excellent source of EPA (25 to 30% of total lipids), and AA (up to 4-5% of total lipids) displayed similar results in our study (23% of EPA and 4.4% of AA). Regarding DHA, our values for Prymnesiophyceae (*Isochrysis galbana* and *Pavlova lutherii*) were respectively 16% and 13.5% of total fatty acids and comparable to literature (10%). Finally, reports allocated EPA content of 20-28% for the genus *Pavlova sp* (Volkman et al., 1989, Volkman et al. 1991) and of 0.2% for *Isochrysis galbana* (Volkman et al., 1989). Our concentrates exhibited the same patterns as EPA content of concentrates from *Pavlova lutherii* and *Isochrysis galbana* after a 8-week storage at 4°C were 17% and 1.5% of total fatty acids respectively.

## 2.5 Conclusion

Preservation of microalgae of marine origin is crucial to extend their shelf-life but also to make live feed available for aquaculture nutrition. Results of this study are promising in the way that the used concentration method contributes to extend significantly the time storage of microalgal concentrates while maintaining their nutritional properties. Thus, microalgae which have conserved their organoleptic quality (odour and colour) as well as their nutritional quality can be available in all seasons for hatcheries. Assuming that microalgal production represents roughly one third of total hatchery production costs, the guarantee of a sustainable supply of high quality microalgal concentrates constitutes a reliable alternative to strengthen productivity and maintain cost-effectiveness.

## **CHAPITRE TROIS**

### **ENRICHISSEMENT DES MICROALGUES EN ACIDES GRAS POLYINSATURÉS POUR LES BESOINS EN AQUACULTURE**

## Résumé

Deux diatomées Bacylarophytes appartenant à l'ordre des Centrales, *Chaetoceros gracilis* (souche Chgra) et *Thalassiosira pseudonana* (souche Actin) ont été mises en culture semi-continue dans des photobioréacteurs de 260L à la Station Aquacole de Pointe-au-Père et au Centre Aquacole Marin de Grande Rivière (Chgra). Vers la fin de la phase de croissance exponentielle, les cultures ont été transférées dans des kwall (avec et sans lumière) pour subir un stress nutritionnel afin d'augmenter la teneur des microalgues en lipides notamment en acides gras polyinsaturés. Les rendements à Pointe-au-Père semblent meilleurs puisque les valeurs de comptes cellulaires (autour de 8 millions cellules/ml) ont été beaucoup plus élevées qu'à Grande Rivière (entre 4 et 5 millions de cellules/ml). Pour l'ensemble des deux sites, le facteur lumière n'a pas eu d'effet sur la densité cellulaire. L'enrichissement des deux diatomées à Pointe-au-Père a montré que le temps avait un effet significatif sur la composition de Chgra en grandes classes de lipides ( $p \leq 0,001$ ) et en acides gras ( $p \leq 0,05$ ). Au niveau des acides gras polyinsaturés, la proportion d'EPA a quadruplé, celle de DHA doublé et celle d'AA triplé.

### 3.1 Introduction

Avec l'intensification des méthodes de culture et le développement des écloseries, la nutrition est devenue l'un des facteurs clé du succès de l'industrie aquacole. Une importance grandissante est accordée à la composition chimique de la nourriture notamment en acides gras polyinsaturés (PUFA) dont la principale source dans le milieu marin est le phytoplancton (microalgues). C'est ainsi que Brown et Garland (1989) ont rapporté que le plus important aspect des lipides dans la nutrition animale est lié à la teneur et à la proportion des microalgues en acides gras. Dans le même élan, Muller-Feuga (2000) a affirmé que l'aquaculture dépend des lipides marins en raison des besoins nutritionnels en acides gras polyinsaturés.

Les acides gras polyinsaturés, comme l'acide éicosapentaénoïque (C20:5n-3, EPA), l'acide docosahexaénoïque (C22:6n-3, DHA) et l'acide arachidonique (C20:4n-6, AA), suscitent de plus en plus d'intérêt en raison de leurs excellentes propriétés nutritionnelles, en biotechnologie, en pharmacutique et en nutraceutique. Chez beaucoup d'animaux marins, l'EPA et l'AA sont obtenus directement à partir de la nourriture et une petite partie est transformée en leucotriène qui est un anti-inflammatoire (Tocher et al, 1987) et en prostaglandine qui est un éicosanoïde nécessaire pour la croissance et la reproduction (Ruggeri et al, 1985). Le DHA est la molécule la plus saturée de la famille des acides gras oméga-3. Cet acide gras polyinsaturé possède d'excellentes propriétés médicales puisque sa présence dans la nutrition a été positivement corrélée avec la prévention de nombreuses maladies humaines dont le cancer et les maladies cardiovasculaires (Holub, 2002). En outre, le DHA est impliqué dans le fonctionnement du cerveau et de la rétine (Galli, 1999) et son

interaction avec d'autres lipides membranaires particulièrement le cholestérol, joue un rôle primordial dans la modulation structurelle et fonctionnelle de la membrane cellulaire (Stillwell et Wassall, 2003). Toujours selon Stillwell et Wassall (2003), il est étonnant qu'une simple molécule ait été décrite comme impliquée à la fois dans plusieurs fonctions biologiques distinctes. La multitude de recherches menées sur les acides gras polyinsaturés à longue chaîne ainsi que sur les écosanoïdes associés ont souligné leur implication dans les fonctions homéostatiques des animaux. En conséquence, bon nombre d'agences nationales ont recommandé leur utilisation comme additifs alimentaires (Gill et Valivety, 1997). Cette situation a encouragé la recherche à s'intéresser au développement de méthodes de culture qui permettent de maximiser la production d'acides gras polyinsaturés par les microalgues. A cet effet, différentes méthodes qui agissent sur l'environnement des cultures de microalgues (lumière, température et surtout stress nutritionnels) sont utilisées (Shifrin et Chisholm, 1981 ; Carvalho et Malcata, 2004). La maximisation ou l'enrichissement des microalgues en acides gras polyinsaturés peut être cruciale pour la production de certaines espèces en aquaculture (Watanabe et al, 1983).

Dans cette étude, les espèces choisies appartiennent à la classe des Bacylarophyceae qui sont des diatomées centriques, c'est à dire appartenant à l'ordre des Centrales. Ces diatomées possèdent des frustules circulaires, bipolaires ou elliptiques dont les auréoles ou perforations sont disposées par rapport à un point central. Par opposition aux Centrales, les auréoles des Pennales sont disposées par rapport à une ligne. Les diatomées sont une classe de microalgues ayant une importance capitale dans plusieurs processus biologiques à l'échelle de la planète. C'est ainsi qu'elles sont responsables de

25% de la production primaire globale (Scala et Bowler, 2001) et de 40% de la production primaire marine (phytoplancton eucaryote) (Falkowski et al, 1998). Elles sont utilisées pour la production extracellulaire de silice dans des applications dans le domaine des nanotechnologies. Au niveau intracellulaire, certains métabolites (lipides, EPA) sont très convoités pour leur application en pharmacie alors que d'autres (acides aminés) sont utilisés en cosmétique. D'autres métabolites extracellulaires qui sont produits dans le médium tels que les pigments, les bactériocines et les antibiotiques sont exploités en biotechnologie (Cohen, 1999 ; Tadashi et al. 2005 ; Wijffels, 2008).

Contrairement à la plupart des espèces d'algues produites commercialement (*Chlorella*, *Spirulina*, *Dunaliella*) qui croissent dans des conditions très sélectives conduisant à de faibles contaminations (autres algues, protozoaires), les diatomées ne possèdent pas cet avantage sélectif et doivent par conséquent être cultivées de façon le plus axénique possible dans des systèmes fermés (Borowitzka, 1994). Les espèces sélectionnées (*Chaetoceros gracilis* souche *Chgra* et *Thalassiosira pseudonana* souche *Actin*) sont largement utilisées en aquaculture pour leurs qualités nutritionnelles. En effet, *Chaetoceros gracilis* occupe la 1<sup>ère</sup> place des espèces les plus performantes pour la croissance de l'huître creuse *Ostrea edulis* (Enright et al, 1986a). Quant à *Thalassiosira pseudonana*, elle est classée en 5<sup>ème</sup> position des 10 espèces de microalgues les plus utilisées dans les écloséries d'huîtres (Coutteau et Sorgeloos, 1992). De plus, elle occupe la 6<sup>ème</sup> place des 10 meilleures espèces de microalgues pour la croissance de l'huître creuse *Ostrea edulis* (Enright et al, 1986a).

Les objectifs spécifiques de ce chapitre étaient :

- L'identification de l'espèce de diatomée la plus appropriée à l'enrichissement en acides gras polyinsaturés durant le stress nutritionnel.
- L'identification de co-produits extractibles en parallèle aux acides gras, tels que les pigments.

### 3.2 Matériel et Méthode

Deux espèces de diatomées *Chaetoceros gracilis* (Figure 3.1) souche **Chgra** et *Thalassiosira pseudonana* (Figure 3.2) souche **Actin** ont été mises en culture dans des photobioréacteurs de 260 L fonctionnant selon un système semi-continu dénommé procédé à efficacité prolongée pour la production d'algues « PEPPA » (Figure 3.3). Cette méthode a été développée par l'ISMER pour optimiser le système de production semi-continu de microalgues en améliorant significativement la productivité biologique et la longévité des cultures. En production, les modules sont disposés côte à côte et des rampes d'éclairage sont insérées entre eux de façon à ce que les photobioréacteurs soient éclairés sur les deux côtés. L'unité de traitement des liquides du PEPPA possède la particularité de pouvoir effectuer la filtration et la stérilisation du milieu nutritif et des solutions de nettoyage et de désinfection en une seule étape grâce à l'utilisation d'une cartouche de fibres creuses. La fine porosité de la membrane (100 000 Da) ainsi que sa grande surface (13m<sup>2</sup>) permettent de stériliser de grands volumes de liquide. Au cours de la croissance des microalgues, le dioxyde de carbone CO<sub>2</sub> est ajouté pour compenser la consommation due à la photosynthèse mais aussi pour réguler le pH des photobioréacteurs.

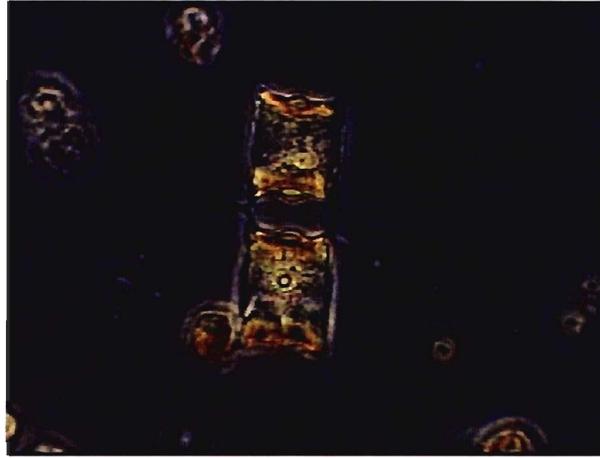


Figure 3.1 : *Chaetoceros gracilis* (Source : <http://www.reed-mariculture.com/microalgae/chgra.htm>)

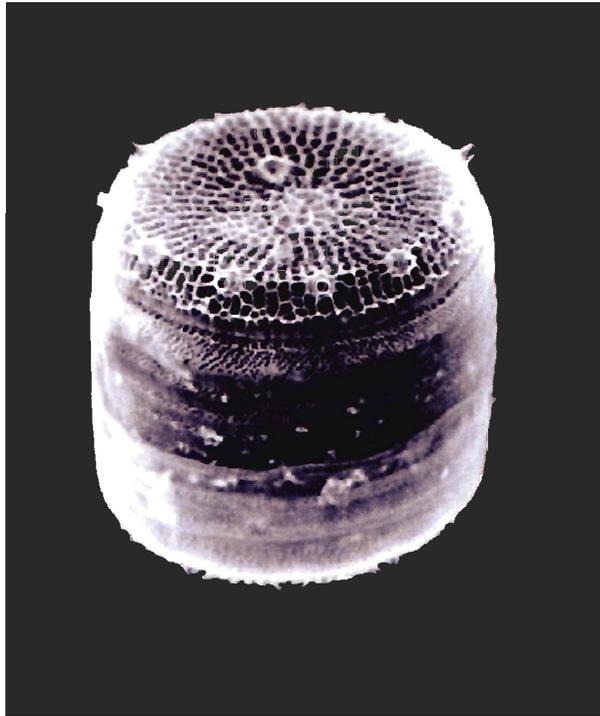


Figure 3.2 : *Thalassiosira pseudonana* (Source : <http://www.eurekalert.org/multimedia/pub/2636.php>)

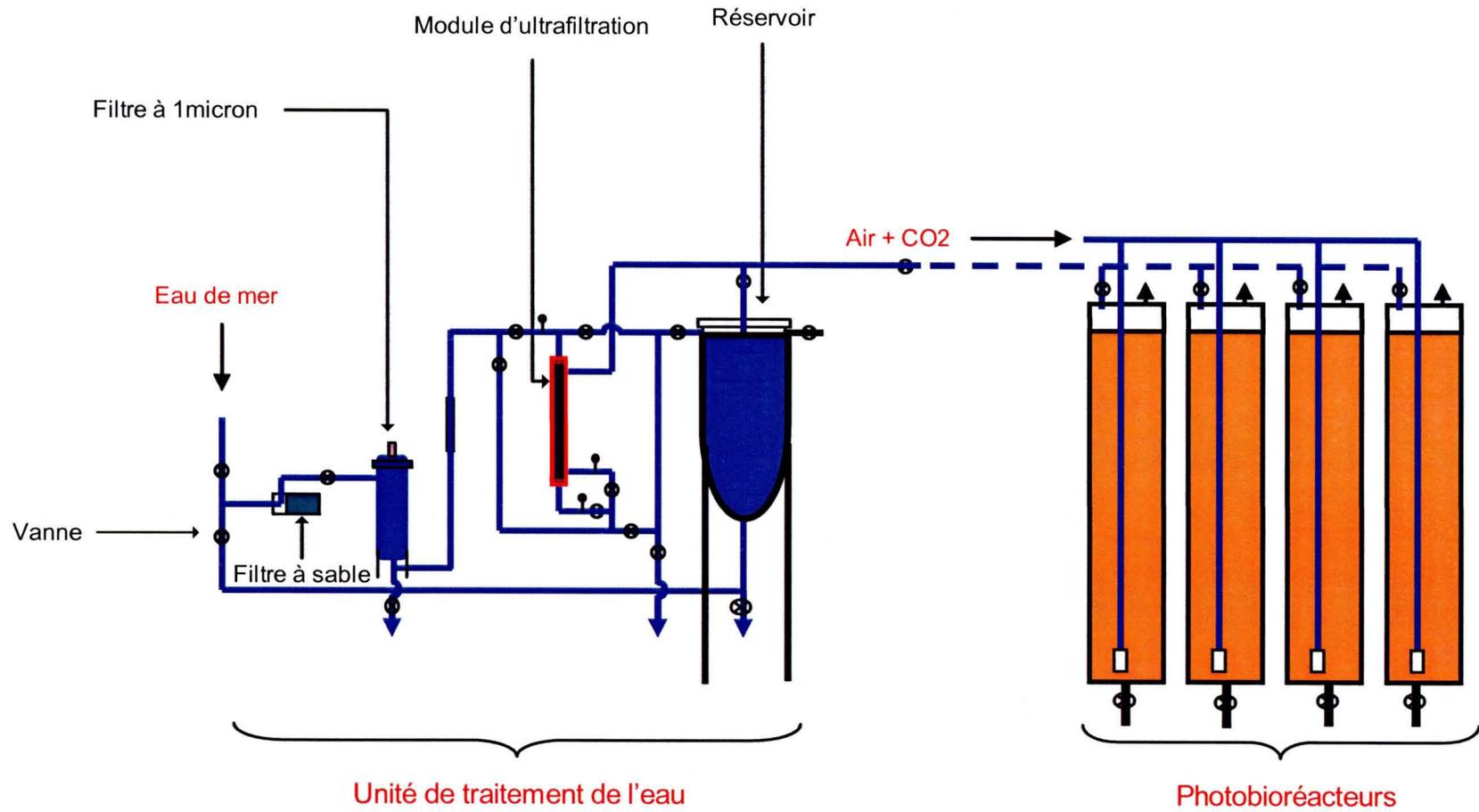


Figure 3.3 : Schéma du système de culture en semi-continu (PEPPA)

### 3.2.1 Stress nutritionnel (carence en silicate)

Lorsque les cultures ont atteint la fin de la phase de croissance exponentielle, un volume correspondant à environ 30 à 40% par PEPPA (90 à 100 litres) a été transféré dans des bassins de type kwall (tubes de 200L) pour la mise en œuvre du stress nutritionnel en silicate (Figure 3.5). À ce moment, le milieu nutritionnel F/2 (Guillard, 1975) non enrichi en silicate est ajouté. Lors des premières expériences menées à Grande-Rivière et à Pointe-au-Père, les stress ont été effectués durant 24 heures avec et sans lumière pour évaluer l'impact de celle-ci sur l'enrichissement. Pour l'étude comparative des deux sites, les mêmes souches de microalgues ont été utilisées en même temps. Les deux systèmes PEPPA étaient identiques dans toutes leurs composantes et les expériences ont été réalisées à la même température afin de limiter le plus possible, les autres variables que la qualité de l'eau de mer entre ces deux sites. Pour l'expérience 2, le stress nutritionnel au silicate a été effectué sur des cultures réalisées à Pointe-au-Père durant 10 jours afin d'évaluer l'enrichissement potentiel en acides gras polyinsaturés. Le schéma expérimental décrivant l'ensemble des expériences menées dans cette étude est ainsi présenté (Figure 3.6).



Figure 3.4 : Inoculation des photobioréacteurs à partir d'une culture en touri de 20 L

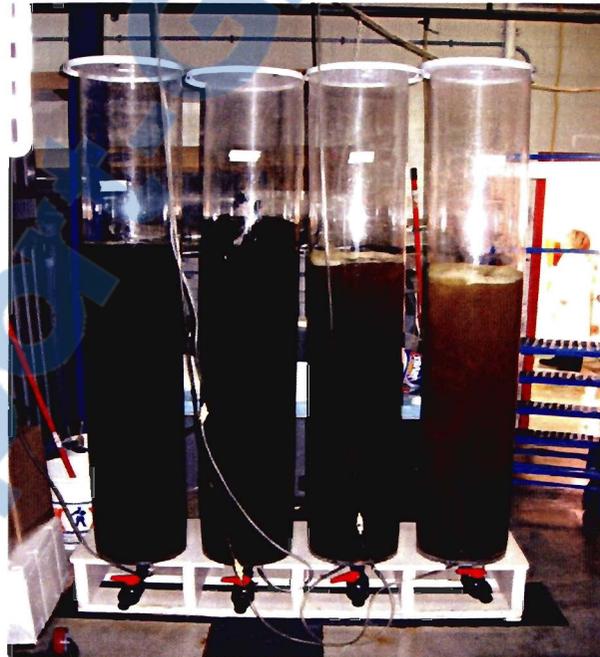


Figure 3.5 : Enrichissement des microalgues en kwalls

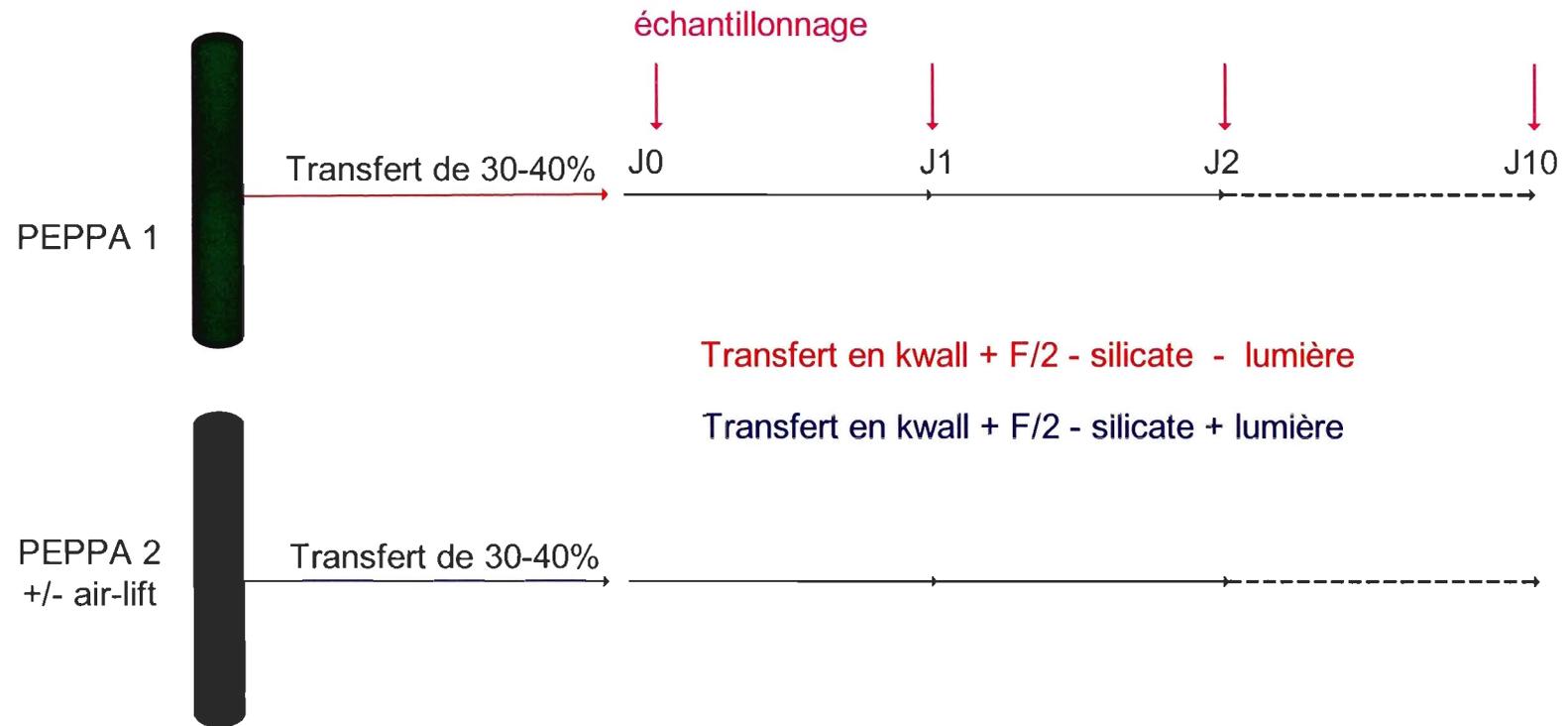


Figure 3.6 : Design expérimental de l'enrichissement à Grande-Rivière (1) et à Pointe-au-Père (2)

### 3.2.2 Échantillonnage

Suite à l'inoculation des photobioréacteurs, les cultures ont été rigoureusement suivies de façon hebdomadaire (mesure du pH, comptage cellulaire et évaluation de la taille au moyen du compteur de particules Beckman Z2 Counter Coulter, Fullerton, CA, USA). Le plateau de croissance était indiqué par une valeur de compte quasi-constante. À ce moment, un premier échantillon a été prélevé pour les analyses de lipides avant le transfert en kwalls. Durant l'expérience un, comparant les sites de Grande-Rivière et de Pointe-au-Père, un échantillon a été récolté dans chaque kwall à 18h et 24h après le stress nutritionnel en silicates. Concernant l'expérience deux sur l'enrichissement en acides gras, les échantillons ont été prélevés toutes les 24h durant la période complète du stress en silicate. Aux mesures de pH et de comptage cellulaire, des échantillons pour l'estimation des poids secs et des analyses de lipides ont été ajoutés. La mesure du poids sec des algues est mise en œuvre par filtration d'un volume de 10 ml de culture sur des filtres de type GF/C (0.45µm) d'un diamètre de 2,5cm précuits au four à 450°C pendant 2 h et pesés avant leur utilisation. Une fois l'échantillon filtré, une solution de formiate d'ammonium à 3% a été ajoutée pour dissoudre les sels et les filtres ont été séchés dans l'étuve à 70°C pendant 24 h puis dans un dessiccateur pendant 24 h et pesés.

$$P_a = P_{f+a} - P_f$$

$$PS = P_a / (V * C)$$

$P_f$  : poids filtre sec (avant filtration) en g.

$P_a$  : poids algues séché en g.

$P_{f+a}$  : poids filtres + algues (après séchage) en g.

V : volume filtré en ml.

C : concentration cellulaire en  $10^6$  cellules/ml.

PS : poids sec en g/ $10^6$  cellules

Les échantillons pour les analyses de lipides ont été filtrés de la même manière que pour les poids secs mais sans rinçage au formiate d'ammonium, puis les filtres sont immergés dans des vials contenant 2 mL de mélange chloroforme-méthanol 2:1 (V/V). Ensuite, les vials ont été passés sous un courant d'azote pour préserver les échantillons de l'oxydation, avant d'être congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'analyse chimique.

### 3.2.3 Analyses chimiques

La fraction lipidique des échantillons de microalgues a été extraite par la méthode de Folch et al. (1957). Les grandes classes de lipides ont été analysées par Iatroscan MK6™ (Iatron Technologies, Tokyo, Japon) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et couplé avec un chromatographe à couche mince. Les chromatogrammes ont été intégrés et analysés au moyen du logiciel d'intégration Peak Simple version 3.2, SRI Inc. Les acides gras ont été analysés avec un chromatographe en phase gazeuse de marque Trace GC (Thermo, USA) équipé avec une colonne capillaire VB-5® (30 m x 0,25 mm i.d; ValcoBond®, USA) avec l'hélium de haute pureté comme gaz porteur. Il a été couplé avec un spectromètre de masse Polaris Q (Thermo, USA). La détection et la quantification des FAME ont été réalisées en appliquant le mode en balayage des ions positifs du spectromètre de masse avec un intervalle de masse de 60 à 650 uma. Une calibration externe a été utilisée avec cinq points de calibrage de  $6,25 \mu\text{g ml}^{-1}$  à  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ , à partir des dilutions appropriées du standard FAME dans un mélange

hexane:dichlorométhane. Le contrôle de l'appareil, l'acquisition et le traitement des données ont été réalisés avec le logiciel Xcalibur® (revision 1.3) de Thermo (USA).

L'astaxanthine, pigment présent chez certaines microalgues, a été analysée pour *Chaetoceros gracilis* par un système de chromatographie liquide haute performance (HPLC, ProStar Varian Inc., Walnut Creek, CA, USA) composé d'un auto-échantillonneur de modèle 410, d'un module de pompe quaternaire de modèle 240 et d'un détecteur PDA de modèle 335. La colonne utilisée pour la séparation était une Microsorb-MV 100-5 C18 250x4.6mm (Varian Inc., Walnut Creek, CA, USA). Auparavant, l'échantillon de lipides était obtenu des algues par extraction en phase solide en utilisant un montage SPE (solid phase extraction) muni d'une pompe et dont les colonnes étaient remplies par 100 mg de silice de qualité analytique. La silice était conditionnée par 1ml d'heptane et 200 µl de l'échantillon étaient transférés dans la colonne et élués jusqu'à ce que le niveau du solvant atteigne le haut du niveau de la silice. La colonne était ensuite nettoyée avec 1ml d'heptane et 1ml d'éther éthylique à 6% dans l'heptane. Cette étape élimine les lipides et les bêta-carotènes. Les pigments sont alors élués dans des tubes propres en utilisant 1ml d'acétone et l'absorbance mesurée au spectrophotomètre à la longueur d'onde maximale (~ 475 nm) après avoir fait une lecture de l'acétone comme blanc. Cette phase d'extraction a été suivie par l'hydrolyse des pigments ou saponification en milieu alcalin avec une solution à 2% de KOH dans du méthanol pur pendant 15 minutes. Ensuite, 2 ml de NaCl à 10% a été ajouté pour arrêter la réaction suivi de 100 µl du standard interne (Apo-8'-caroténal à 3,38 µg/ml d'acétone) pour ajuster les pertes liées à la phase aqueuse non enlevée lors de l'extraction. L'extrait était centrifugé à 5000 RPM pendant 2 minutes et la phase

aqueuse débarrassée. La phase organique était alors lavée à deux reprises avec 2 ml d'une solution de NaCl à 10% ensuite avec 1 ml d'eau distillée plus 1 ml de diéthyléther et enfin évaporé à sec et redissous dans 0,5 ml de phase mobile. L'échantillon de pigments était ainsi prêt pour l'injection au HPLC.

### **3.2.4 Analyse statistique**

Les données ont été traitées par analyse de variance multiple (MANOVA) en utilisant le logiciel de statistique SPSS 15.0 pour Windows afin de déterminer les différences entre les classes de lipides (TAG, AMPL, PL) mais aussi entre les différents acides gras (EPA, DHA, AA) et groupes d'acides gras (Saturés, MUFA, PUFA). Le test de Tukey a été utilisé pour déterminer le cas échéant, les différences significatives spécifiques. Les variables dépendantes étaient les grandes classes de lipides ou les différents acides gras et les facteurs étaient les traitements subis dans les photobioréacteurs (normal ou à air-lift) et le temps de stress. Pour l'étude comparative des sites d'expérimentation, le compte cellulaire a été utilisé comme variable dépendante alors que la lumière et le temps étaient les facteurs. L'astaxanthine a été analysée en utilisant une analyse de variance (ANOVA) où la variable dépendante était l'astaxanthine et la lumière et le temps les facteurs.

## **3.3 Résultats**

### **3.3.1 Étude comparative de deux sites**

Deux expériences ont été menées dans la même période c'est-à-dire en mai-juin 2007 dans deux zones géographiques distinctes (Grande-Rivière en Gaspésie et Pointe-au-Père dans le Bas Saint-Laurent). La zone de Grande-Rivière était caractérisée par une

eau de type océanique avec une température au mois de juin 2007 comprise entre 7,5 et 10°C (Annexe 5) et des valeurs de salinité entre 31,6 et 31,9 ‰ (Annexe 6). L'eau de Pointe-au-Père est de type estuarien. Entre l'été et l'automne, elle comportait des valeurs moyennes de température se situant entre 7 et 12°C (Annexe 7) alors que la salinité moyenne durant cette période oscillait entre 25 et 31‰ (Réal Fournier, com. pers.).

Les résultats présentés dans les figures 3.7 et 3.8, montrent l'évolution du compte cellulaire de *Chaetoceros gracilis* suite à un stress nutritionnel en silicate. À Grande-Rivière, les comptes ont démarré à 4,6 millions de cellules/ml après le transfert dans les kwalls. Auparavant la concentration cellulaire dans les photobioréacteurs avait pu atteindre 11 millions de cellules/ml mais les cultures ont été renouvelées au 2/3 en raison d'une contamination par des protozoaires. Ainsi, les comptes cellulaires dans les kwalls avec lumière sont passés en moyenne de 4,6 à 5 millions de cellules/ml 18 h plus tard avant de redescendre jusqu'à 4,3 millions de cellules/ml au bout de 24 h de stress de carence en silicates. En l'absence de lumière, les comptes cellulaires dans les kwalls ont d'abord diminué de 4,6 millions de cellules/ml à 4,3 millions de cellules/ml avant de remonter à 4,6 millions de cellules/ml après 24 h (Figure 3.7). Le facteur lumière n'a pas eu d'effet significatif sur la densité cellulaire dans les kwalls ( $p > 0,05$  ;  $df = 1$ ,  $F = 0,045$ ) ainsi que le facteur temps ( $p > 0,05$  ;  $df = 2$  ;  $F = 0,1$  ; Annexe 8).

Dans la même période à la station aquacole de Pointe-au-Père, les cultures ont été transférées après avoir atteint une concentration moyenne de 7,9 millions de cellules/ml. Dans les kwalls avec lumière, les comptes sont passés à 8,4 millions de cellules/ml

après 18 h avant d'atteindre 8,6 millions de cellules/ml après 24 h. En l'absence de lumière l'augmentation de la concentration cellulaire a été plus lente puisque les comptes sont passés à 8,2 millions de cellules/ml après 18 h où ils se sont stabilisés jusqu'à la fin du stress nutritionnel (Figure 3.8). Le facteur lumière n'a pas eu d'effet significatif sur la densité cellulaire des microalgues ( $p > 0,05$ ,  $df = 1$ ,  $F = 0,050$ ) ainsi que le facteur temps ( $p > 0,05$  ;  $df = 2$  ;  $F = 0,94$  ; Annexe 9).

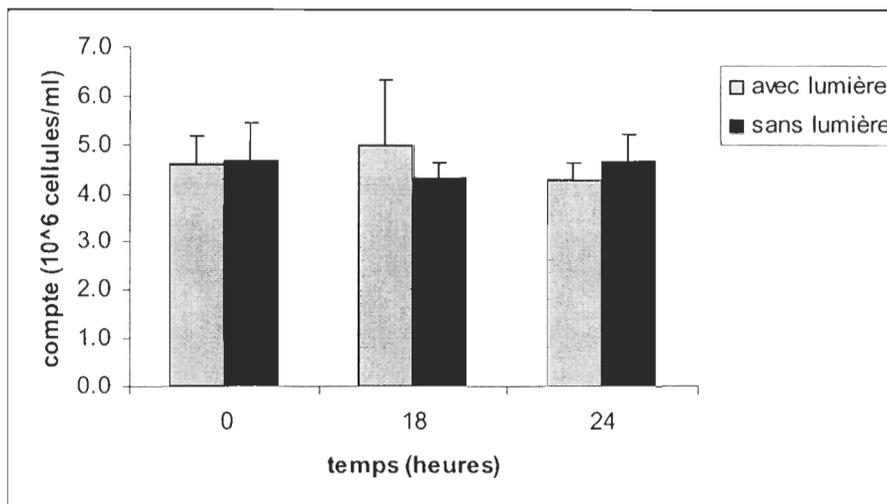


Figure 3.7 : Évolution de la concentration cellulaire lors d'une carence en silicates de *Chaetoceros gracilis* à Grande Rivière.

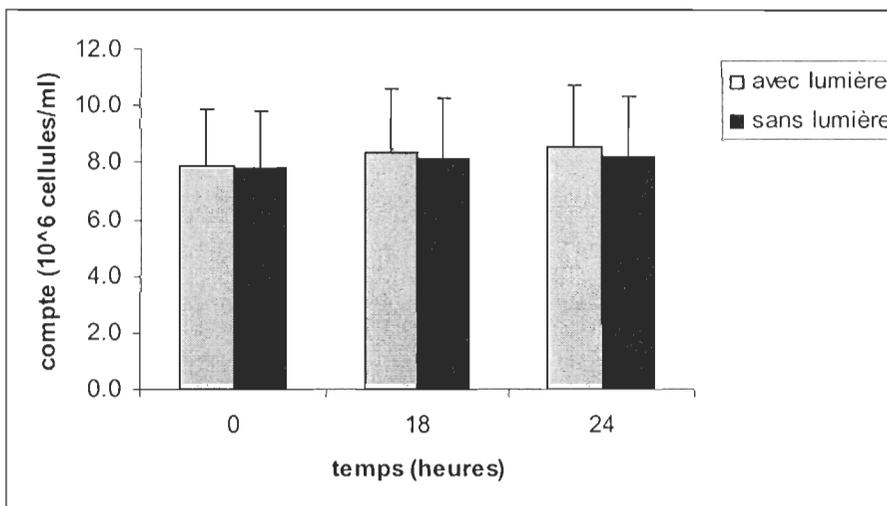


Figure 3.8 : Évolution de la concentration cellulaire lors d'une carence en silicate de *Chaetoceros gracilis* à Pointe-au-Père.

### 3.3.2 Production d'astaxanthine à Pointe-au-Père

Lors de l'expérience menée durant l'été 2007 et décrite précédemment, des analyses d'astaxanthine ont été effectuées sur les cultures. Ce pigment se retrouve dans la classe des lipides polaires mobiles dans l'acétone (AMPL).

Les résultats (Figure 3.9) révèlent que la production d'astaxanthine lors du stress ne varie pas entre 0 et 18 h de carence à la silice avec une valeur moyenne de 0,21 mg/g MS ( $p > 0,05$  ;  $df = 1$  ;  $F = 0,002$  ; Annexe 14) pour l'ensemble des traitements (lumière ou sans lumière).

### 3.3.3 Enrichissement de deux espèces de diatomées

À la station aquacole de Pointe-au-Père, des cultures en PEPPA suivies d'un stress nutritionnel par une carence en silicates, ont été menées au cours de l'automne 2007. Deux espèces de diatomées ont été testées en duplicat dans des photobioréacteurs (PEPPA classiques et à *air-lift* pour *Chaetoceros gracilis* souche Chgra et PEPPA classiques seulement pour *Thalassiosira pseudonana* souche Actin). Le système de culture à *air-lift* se caractérise par l'aménagement à l'intérieur du photobioréacteur, d'une colonne noire en plastique ABS appelée colonne à air-lift qui permet d'injecter de l'air comprimé dans le but de propulser le liquide tout au long des tubes du photobioréacteur et également d'injecter le gaz carbonique, élément indispensable à la photosynthèse. Ce système permet le passage régulier des microalgues dans un cycle de noirceur-lumière.

### 3.3.3.1 Grandes classes de lipides

#### 3.3.3.1.1 Effet du traitement

Un montage à *air-lift* a été utilisé pour améliorer l'efficacité du système PEPPA classique pour *Chaetoceros gracilis*. Les résultats statistiques n'ont montré aucune différence significative entre les deux traitements ( $p > 0,05$  ;  $df = 1$  ; Annexe 10) au niveau des classes de lipides. En conséquence, les résultats exprimés en % de lipides totaux (mg/g MS), sont représentés par la moyenne des deux traitements (Figure 3.9).

#### 3.3.3.1.2 Effet du temps

L'évolution des grandes classes de lipides pour *Chaetoceros gracilis* (Figure 3.9) est marquée par des variations significatives des pourcentages moyens des TAG, des AMPL et des PL ( $p < 0,05$  ;  $df = 8$  ; Annexe 10). Les TAG ont connu une baisse de 70,6% au jour 0 à 19 % au jour 4 avant d'augmenter lentement jusqu'à 30% au 10<sup>ème</sup> jour de stress (Figure 3.10). Quant aux AMPL, ils ont augmenté de 9,3% à 40,2% au 5<sup>ème</sup> jour avant de se stabiliser à 32,8% au jour 10. Pour ce qui est des PL, leur proportion a triplé, passant de 19,7% au début du stress au pic de 59,6% au 9<sup>ème</sup> jour.

Concernant *Thalassiosira pseudonana*, le temps n'a pas eu d'effet significatif sur la proportion des grandes classes de lipides ( $p > 0,14$  ;  $df = 7$  ; Annexe 11 ; Figure 3.10).

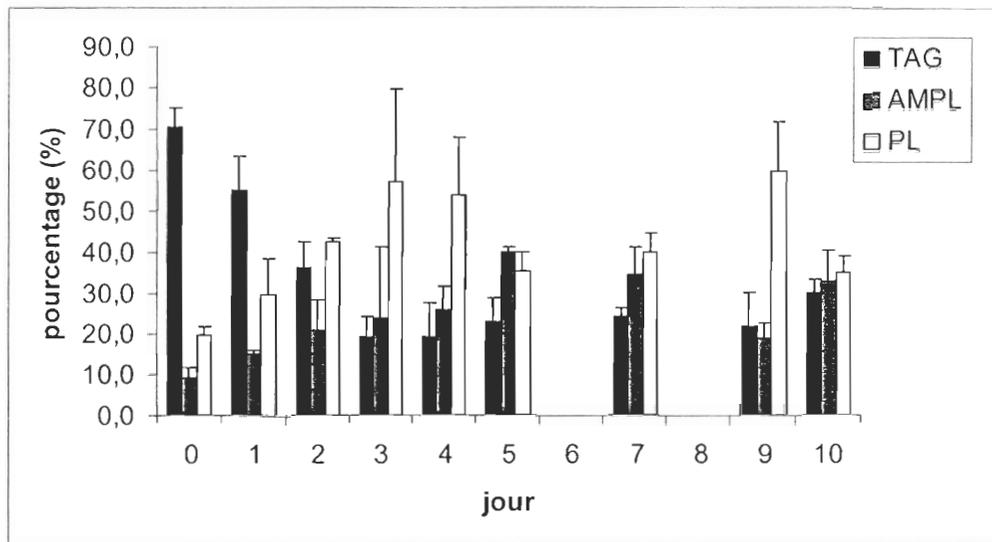


Figure 3.9 : Évolution des grandes classes de lipides exprimées en %  $\pm$  écarts-types de *Chaetoceros gracilis* lors du stress nutritionnel

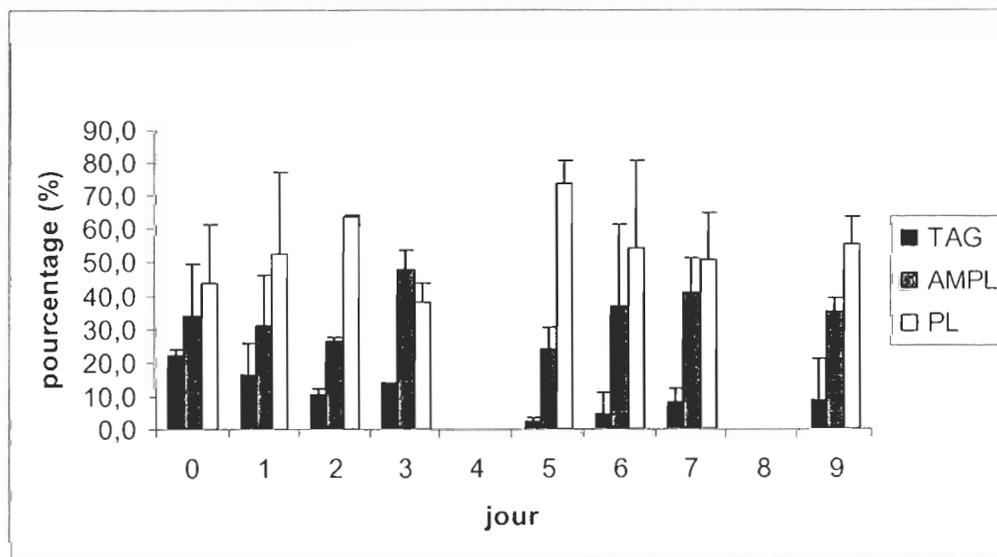


Figure 3.10 : Évolution des grandes classes de lipides exprimées en %  $\pm$  écarts-types de *Thalassiosira pseudonana* lors du stress nutritionnel

### 3.3.3.2 Acides gras

Les résultats des profils en acides gras sont présentés en pourcentage moyen des principaux acides gras avec leurs écarts-types au début et à la fin du stress nutritionnel en silicates pour *Chaetoceros gracilis* et *Thalassiosira pseudonana* (Tableau 3.1). Pour *Chaetoceros gracilis*, les profils en acides gras saturés ont subi des variations importantes qui se sont le plus manifestées par l'acide palmitique C16:0 qui est passé de 45,9% au jour 0 à 16,7% au jour 10 soit une diminution d'environ  $\frac{3}{4}$ . La proportion du plus important des monoinsaturés, le C16:1n-7 a quasiment doublé en passant de 16,5 au jour 0 à 31,4% à la fin du stress. Dans l'ensemble, les PUFA ont plus que doublé puisque leur proportion est passée de 13,7 à 30,3%. Pour *Thalassiosira pseudonana*, aucune variation importante ne fut observée.

Tableau 3.1 : Pourcentages moyens d'acides gras  $\pm$  écarts-types pour *Chaetoceros gracilis* et *Thalassiosira pseudonana* avant et après le stress.

acides gras	<i>Chaetoceros gracilis</i>		<i>Thalassiosira pseudonana</i>	
	Jour 0	Jour 10	Jour 0	Jour 9
C12:0	0,84 $\pm$ 0,18	0,56 $\pm$ 0,14	0,61 $\pm$ 0,03	1,02 $\pm$ 0,14
C14:0	10,89 $\pm$ 4,19	12 $\pm$ 0,79	9,97 $\pm$ 1,95	10,94 $\pm$ 3,63
C15:0	1,04 $\pm$ 0,46	0,67 $\pm$ 0,07	1,1 $\pm$ 0,14	1,3 $\pm$ 0,15
C16:0	45,86 $\pm$ 9,09	16,71 $\pm$ 0,84	20,54 $\pm$ 1,38	15,48 $\pm$ 3,11
C17:0	0,67 $\pm$ 0,45	0,33 $\pm$ 0,02	0,49 $\pm$ 0,03	0,76 $\pm$ 0,1
C18:0	2,35 $\pm$ 0,95	1,27 $\pm$ 0,08	1,26 $\pm$ 0,26	2,13 $\pm$ 0,44
C20:0	0,89 $\pm$ 0,63	0,44 $\pm$ 0,03	0,65 $\pm$ 0,04	0,95 $\pm$ 1,18
C22:0	1,2 $\pm$ 0,85	0,64 $\pm$ 0,04	0,85 $\pm$ 0,09	1,17 $\pm$ 0,23
C24:0	1,02 $\pm$ 0,65	0,93 $\pm$ 0,14	1,06 $\pm$ 0,32	1,5 $\pm$ 0,24
<b><math>\Sigma</math> saturés</b>	<b>64,8</b>	<b>33,6</b>	<b>36,5</b>	<b>35,3</b>
C16:1n-7	16,51 $\pm$ 6,46	31,39 $\pm$ 1,05	32,52 $\pm$ 10,03	21,96 $\pm$ 5,27
C18:1n-9	2,28 $\pm$ 0,37	2,71 $\pm$ 0,63	3,07 $\pm$ 0,21	6,04 $\pm$ 0,31
C20:1	0,72 $\pm$ 0,53	0,36 $\pm$ 0,02	0,55 $\pm$ 0,04	0,83 $\pm$ 0,16
C22:1n-9	0,41 $\pm$ 0,23	0,29 $\pm$ 0,01	0,5 $\pm$ 0,1	0,71 $\pm$ 0,12
<b><math>\Sigma</math> MUFA</b>	<b>19,9</b>	<b>34,8</b>	<b>36,6</b>	<b>29,5</b>
C18:2n-6	1,05 $\pm$ 0,07	0,69 $\pm$ 0,1	1,09 $\pm$ 0,02	1,47 $\pm$ 0,1
C20:2	0,73 $\pm$ 0,19	0,4 $\pm$ 0,02	0,63 $\pm$ 0,03	0,92 $\pm$ 0,19
C18:3n-6	1,74 $\pm$ 0,8	1,62 $\pm$ 0,16	0,54 $\pm$ 0,01	3,45 $\pm$ 0,55
C20:3n-3	0,73 $\pm$ 0,33	0,38 $\pm$ 0,04	0,55 $\pm$ 0,03	0,81 $\pm$ 0,16
C20:3n-6	2,06 $\pm$ 0,32	0,28 $\pm$ 0,12		0,56 $\pm$ 0,11
C20:4n-6	2,52 $\pm$ 1,27	8,19 $\pm$ 0,46	0,75 $\pm$ 0,09	1,07 $\pm$ 0,06
C20:5n-3	3,91 $\pm$ 2,6	16,58 $\pm$ 1,61	15,77 $\pm$ 2,55	16,6 $\pm$ 8,67
C22:6n-3	0,95 $\pm$ 1,17	2,2 $\pm$ 0,33	5,72 $\pm$ 1,98	7,33 $\pm$ 3,87
<b><math>\Sigma</math> PUFA</b>	<b>13,7</b>	<b>30,3</b>	<b>25,1</b>	<b>32,2</b>
<b>Total</b>	<b>98,4</b>	<b>98,7</b>	<b>98,2</b>	<b>97</b>

### 3.3.3.2.1 Effet détaillé du temps

Pour *Chaetoceros gracilis*, les acides gras polyinsaturés essentiels EPA, DHA, AA ont connu des variations significatives au cours du temps ( $p = 0,028$  ;  $df = 9$  ;  $F = 2,44$  ; Annexe 12). La proportion d'EPA a augmenté de manière progressive avec le temps avant d'atteindre une valeur quadruplée en fin de stress (16,58%). La valeur du DHA a doublé en passant de 0,95% à 2,2% au jour 10. Quant à l'acide arachidonique, sa valeur a triplé, passant d'environ 3% à plus de 8% (Figure 3.11).

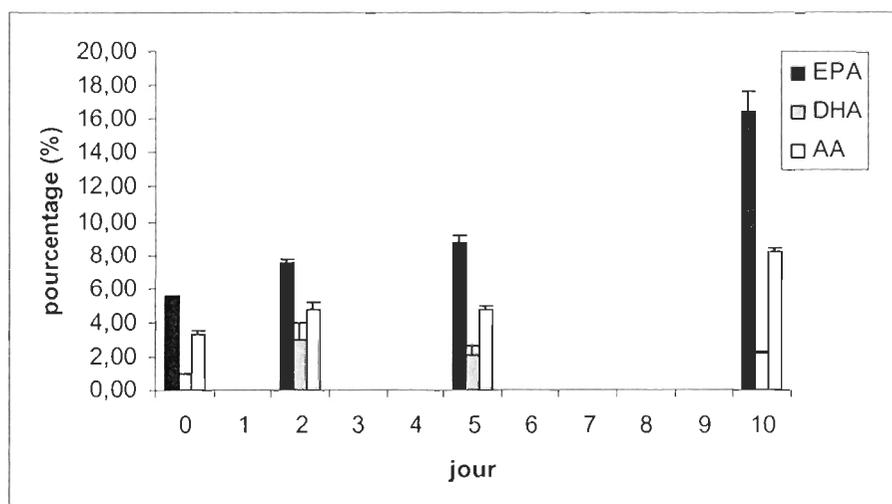


Figure 3.11 : Évolution des principaux acides gras essentiels exprimés en %  $\pm$  écarts-types de *Chaetoceros gracilis* lors du stress nutritionnel

Comme mentionné précédemment, les proportions de PUFA et de MUFA ont connu une évolution à la hausse pendant que celles des acides gras saturés ont sensiblement chuté passant de 65 à 33% soit une diminution environ de moitié (Figure 3.12).

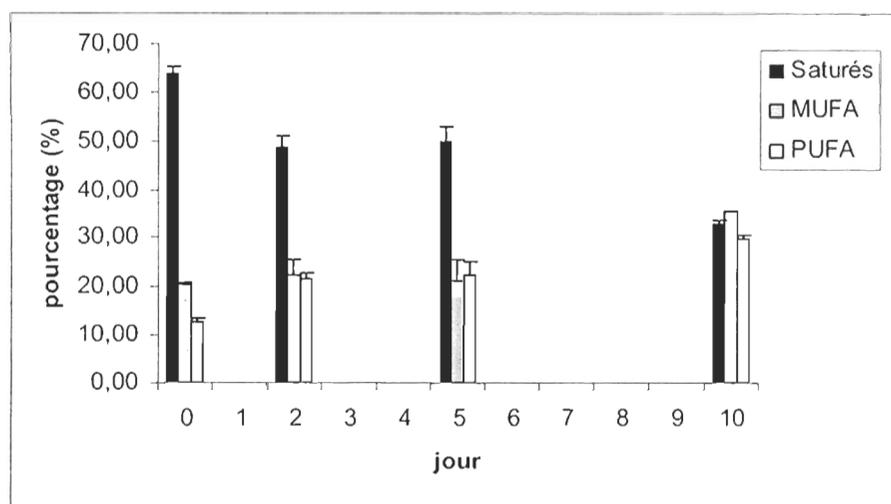


Figure 3.12 : Évolution des acides gras saturés, monoinsaturés et polyinsaturés exprimés en %  $\pm$  écarts-types de *Chaetoceros gracilis* lors du stress nutritionnel

Comme pour les grandes classes de lipides, la durée du stress nutritionnel en silicate n'a pas eu d'effet sur les valeurs d'acides gras pour *Thalassiosira pseudonana* ( $p > 0,05$  ;  $df = 16$  ; Annexe 13). Les figures 3.13 et 3.14 montrent le profil constant des acides gras principaux (EPA et DHA) et des groupes d'acides gras saturés, monoinsaturés et polyinsaturés.

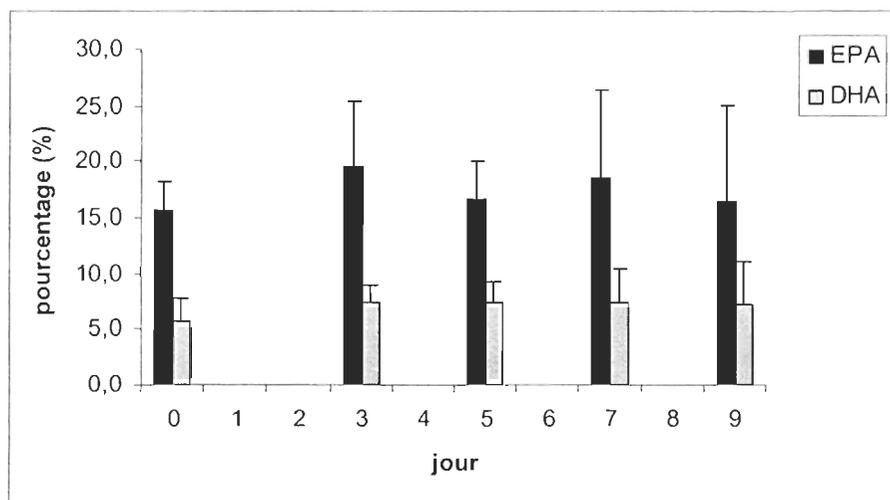


Figure 3.13 : Évolution des principaux acides gras essentiels exprimés en %  $\pm$  écarts-types de *Thalassiosira pseudonana* lors du stress nutritionnel

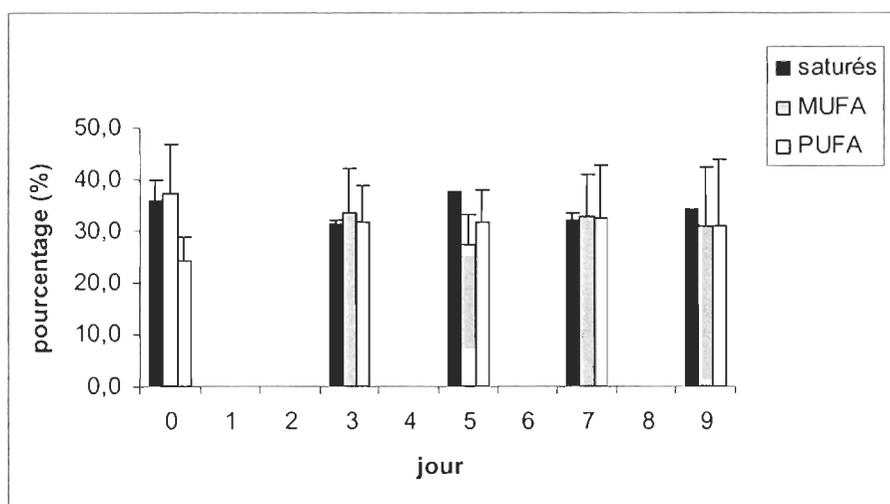


Figure 3.14 : Évolution des acides gras saturés, monoinsaturés et polyinsaturés exprimés en %  $\pm$  écarts-types de *Thalassiosira pseudonana* lors du stress nutritionnel

### 3.4 Discussion

#### 3.4.1 Influence du site géographique

L'analyse comparative des valeurs de concentrations cellulaires entre les deux sites de l'étude montre des valeurs plus élevées pour les cultures réalisées au niveau de Pointe-au-Père. Cela pourrait être lié à la contamination des cultures réalisées à Grande-Rivière par des protozoaires. D'autres facteurs non mesurés pourraient également être en cause. Toutefois, il est clair que l'utilisation du même matériel, des mêmes souches de microalgues ainsi que la mise en œuvre des manipulations dans les mêmes conditions et au même moment, ne garantissent pas la stabilisation de la production et de la qualité des microalgues.

#### 3.4.2 Production d'astaxanthine

L'astaxanthine appartient à la grande famille des caroténoïdes dont elle possède les puissantes propriétés antioxydantes. C'est une substance naturellement présente dans les microalgues notamment chez *Haematococcus pluvialis*. Par le canal de la chaîne alimentaire, on la retrouve dans beaucoup d'organismes marins comme les poissons (saumon, truite), les crustacés (crevette, homard, crabes) et le krill. Plusieurs études ont révélé les vertus de l'astaxanthine en tant que puissant antioxydant (Di Mascio et al, 1991), dans le système immunitaire (Kurashige et al, 1990 ; Bennedsen et al, 1999) mais aussi au niveau des fonctions visuelles (Tso et al, 1996) et anticancéreuses (Tanaka et al, 1994 ; Jyonuchi et al, 1994). L'accumulation d'astaxanthine par l'algue verte *Haematococcus pluvialis* en réponse à certaines conditions extrêmes est bien connue (Harker et al, 1996). La déficience en nutriments essentiels (N, P, Si) ainsi que certains facteurs abiotiques tels que la lumière jouent un rôle prépondérant dans la caroténogénèse chez les algues.

Les résultats de notre étude montrent une valeur moyenne d'astaxanthine pour *Chaetoceros gracilis* de 0,21 mg/g MS soit 6,3 ng/millions de cellules. Cette valeur n'a pas évolué au bout de 18h de stress en silicate ce qui nous permet de déduire que le stress devrait être prolongé pour qu'il y ait une meilleure réponse. En outre, le stress pourrait ne pas avoir d'effet sur la capacité de la souche Chgra à produire l'astaxanthine.

### 3.4.3 Stress nutritionnel

Cette étude concerne deux diatomées centrales (*Chaetoceros gracilis* et *Thalassiosira pseudonana*) caractérisées par la présence d'un frustule en silice qui joue un rôle primordial dans la division cellulaire. Dans la nature, cette carapace siliceuse est synthétisée par l'algue à partir de la silice naturelle. En conditions de culture, la silice doit être apportée par le milieu nutritionnel pour permettre à l'algue unicellulaire de se reproduire. Ainsi le principe de ce stress nutritionnel est basé sur le retrait d'un élément ayant une fonction vitale pour le développement du phytoplancton. Le but étant d'allouer au développement cellulaire du végétal, les réserves énergétiques emmagasinées pour la reproduction (Taguchi et al., 1987, Lombardi et Wangersky, 1991).

Les diatomées réagissent plus rapidement à une déficience en silicate qu'à un autre nutriment du fait qu'elles ne peuvent pas former de cellules filles sans apport de silicates (Shifrin and Chisholm, 1981 ; Taguchi et al, 1987 ; Lombardi et Wangersky, 1991). En effet, les silicates sont apportés sous forme de métasilicate qui est hydrolysé en acide orthosilicique  $\text{Si}(\text{OH})_4$ , et sont déposés sur le frustule de la diatomée sous

forme de silice amorphe hydratée (Riemann et al, 1965). Si les diatomées ne sont pas capables de former un frustule, elles accumulent des lipides (Taguchi et al, 1987). Les lipides accumulés par les microalgues sont sous forme de triglycérides ou triacylglycérols (TAG) qui constituent à ce titre, un important signal biochimique de l'occurrence d'un stress naturel ou artificiel. Ainsi, selon Lombardi et Wangersky (1991), les stress en phosphore, en silicium et en azote chez la diatomée *Chaetoceros gracilis* résultent en l'augmentation de la synthèse des TAG qui sont des composés de réserve.

Dans cette étude, les diatomées testées (*Chaetoceros gracilis* souche **Chgra** et *Thalassiosira pseudonana* souche **Actin**) n'ont pas réagi d'emblée à la déficience nutritionnelle en silicates. Ainsi, les teneurs en TAG ont continué à baisser jusqu'au 4<sup>ème</sup> jour de stress avant d'amorcer une montée jusqu'à la fin de l'expérience. Cette latence dans la réaction au stress pourrait s'expliquer par le fait que les cellules de diatomées ont pu utiliser le peu de silicates qui restaient dans leur milieu de culture pour continuer de croître et utiliser les réserves énergétiques dont principalement les TAG. En effet, les études de Taguchi et al. (1987) ont montré que la prise de silicates par les cellules de diatomées s'était arrêtée lorsque la concentration de silicates dans le médium se situait entre 0,4 et 0,9  $\mu\text{M}$ . La montée des TAG à partir du 4<sup>ème</sup> jour pour Chgra et 5<sup>ème</sup> jour pour Actin, coïncide avec la baisse des PL (Figure 3.10). Ceci pourrait s'expliquer par l'incorporation de certains acides gras notamment les polyinsaturés, dans les TAG. Ce qui peut être confirmé par les résultats de Thonon et al. (2002) selon lesquels *Thalassiosira pseudonana* et *Pavlova lutherii* produisent l'EPA et le DHA qu'elles incorporent dans les TAG durant la phase stationnaire.

La composition moyenne des acides gras durant le stress nutritionnel montre des pourcentages moyens en EPA de 15,8% au début et de 16,6% à la fin du stress pour *Thalassiosira pseudonana*. Zhukova (2004) a trouvé une valeur de 19,3% pour *Thalassiosira pseudonana* en phase stationnaire après une culture de 20 jours. La même tendance a été confirmée par Volkman et al. (1989) qui ont trouvé une valeur relative de 19,3% pour une culture de *Thalassiosira pseudonana* récoltée en phase logarithmique. Quant à *Chaetoceros gracilis*, la proportion en EPA trouvée dans notre étude avant le stress a été de 3,9% alors que celle trouvée par Volkman et al. (1989) a été de 5,7% durant la phase de croissance logarithmique. Par ailleurs, les pourcentages moyens de DHA que nous avons obtenus avant le stress sont de 5,7% pour *Thalassiosira pseudonana* et de 0,9% pour *Chaetoceros gracilis*. Les valeurs trouvées par Volkman et al. (1989) sont respectivement de 3,9% et 0,4% en conditions de croissance logarithmique. Concernant les groupes d'acides gras, les valeurs de notre étude pour *Chaetoceros gracilis* avant le stress étaient de 64,8% en saturés, 19,9% en monoinsaturés et de 13,7% en polyinsaturés. Ces résultats représentent le double de ceux mesurés pour la même espèce avec des taux de 26% de saturés, 35% de monoinsaturés et 38% de polyinsaturés (Seychelles et al., 2008). Volkman et al. (1989) ont trouvé des valeurs similaires à celles de Seychelles et al. (2008) avec des taux de 35,5% d'acides gras saturés. Le profil atypique en acides gras saturés que nous avons mesuré, pourrait être lié aux conditions de culture.

Quant à la composition en acides gras polyinsaturés, la comparaison de nos valeurs avec celles trouvées par Seychelles et al. (2008) sur les algues fraîches sortant des photobioréacteurs, montre que nos valeurs avant le stress sont moins élevées (14% contre 3,9% pour EPA, 2% contre 0,9% pour DHA et 9% contre 2,5% pour AA).

Cependant les proportions trouvées par Volkman et al. (1989) pour *Chaetoceros gracilis* sont beaucoup plus proches de nos valeurs avec 4,6% d'EPA, 0,3% de DHA et 4,5% d'AA. Il ressort de ces comparaisons que nos valeurs d'AA avant le stress nutritionnel sont faibles et cela pourrait être lié à la faible proportion de phospholipides qui était de l'ordre de 20% au début du stress nutritionnel. En effet, les phospholipides constituent une importante source en acide arachidonique (AA) et représentent environ 40% des membranes cellulaires selon Hart et Conia (2000). Concernant *Thalassiosira pseudonana*, les valeurs de notre étude en EPA et en DHA sont respectivement de 15,8% et 5,7%. Les valeurs trouvées par Zhukova (2004) sont assez proches des nôtres avec 19,3% pour l'EPA et 2,2% pour le DHA.

Du point de vue de l'enrichissement, *Chaetoceros gracilis* a mieux répondu que *Thalassiosira pseudonana* surtout au niveau des acides gras polyinsaturés. Cependant, même si les proportions de ce dernier en PUFA (EPA, DHA, AA) ont légèrement augmenté au terme de l'expérience, d'autres tests sont nécessaires pour mieux comprendre le comportement de cette espèce en conditions de carence nutritionnelle.

Au vu des résultats de notre étude, on peut considérer que l'enrichissement en acides gras polyinsaturés des microalgues, notamment de *Chaetoceros gracilis*, a permis de ramener les teneurs en acides gras polyinsaturés à des valeurs normales comparées à la littérature. Cela est dû à un retard observé dans l'atteinte des concentrations normales en acides gras polyinsaturés au niveau des photobioréacteurs, qui pourrait être imputable aux conditions de culture favorisant l'accumulation d'acides gras saturés.

## CHAPITRE QUATRE

### DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALES

#### 4.1 Discussion générale

Cette étude a permis d'une part de suivre l'évolution de la composition lipidique des concentrés de microalgues durant le stockage et d'autre part d'évaluer l'impact du stress nutritionnel en silicates sur le profil en acides gras polyinsaturés de deux espèces de diatomées. En effet, les microalgues qui constituent un élément majeur de la nutrition dans l'élevage des bivalves et des larves de crustacés et de poissons, sont une excellente source d'acides gras polyinsaturés. Ces derniers ont été rapportés par plusieurs auteurs comme indispensables à la croissance et à la survie des larves de beaucoup d'organismes marins (Langdon et Waldock, 1981 ; Whyte et al. 1990 ; Webb et Chu, 1983). Par ce fait leur présence, leur conservation ainsi que leur augmentation dans les cellules de microalgues ont été perçues comme fondamentales aux yeux des aquaculteurs et de la recherche. Sous ce rapport, notre étude sur les concentrés a apporté une contribution à la solution des problèmes d'approvisionnement en microalgues de qualité aux écloseries. Ainsi les tâches multiples, délicates et fastidieuses liées à la culture des algues pourraient être allégées voire disparaître et les aquaculteurs pourraient davantage se focaliser sur leurs activités d'élevage. De plus, les concentrés de microalgues sont faciles à transporter, à manipuler et évitent aux exploitants de travailler avec d'importants volumes d'eau qui sont souvent source de contamination. C'est ainsi que Knuckey (1998) conclut que l'utilisation de concentrés de microalgues pourrait intensifier l'élevage des espèces par la réduction de la dilution des bassins causée par l'addition de grands volumes de cultures d'algues fraîches. Du point de vue de la qualité, ces concentrés sont meilleurs que les pâtes d'algues ou les concentrés produits par centrifugation. A cet effet, Knuckey (1998) a découvert que bon nombre d'espèces de microalgues utilisées pour la nutrition en aquaculture, étaient détruites par

la centrifugation et que leur qualité s'altérait au cours du stockage. En outre, son étude a révélé que la pâte de *Thalassiosira pseudonana* constituait une nourriture de qualité médiocre pour l'huître du Pacifique dont la croissance s'arrêtait au bout de 2 à 3 mois de test nutritionnel. Selon lui, les forces de cisaillement élevées lors de la centrifugation seraient la cause probable de la destruction des cellules qui se détérioraient durant le stockage libérant ainsi les composés organiques lors de la resuspension. Cependant, cette présente étude n'étant qu'un premier pas, il serait intéressant de tester ces concentrés sur différentes espèces de larves afin de valider leurs performances nutritionnelles.

Concernant l'enrichissement des microalgues en acides gras polyinsaturés, il est établi que lorsque certaines microalgues sont astreintes à la privation d'éléments clés de leur nutrition (azote, phosphore, silicates), leurs réserves d'énergie, qui sont sous forme de triglycérides, augmentent (Dunstan et al., 1993 ; Thonon et al., 2002 ; Zhukova et al., 2004). Dans notre étude, les TAG ont d'abord baissé pendant les 5 premiers jours de l'enrichissement avant de commencer à augmenter. Cette tendance peut s'expliquer de deux manières, soit parce que les silicates n'étaient pas complètement consommés au moment du transfert dans les bassins kwalls, ce qui est peu probable puisque les comptes dans les photobioréacteurs semblaient plafonner. Soit aussi parce que les grands volumes des cultures (260 L par photobioréacteur) ralentissaient l'enrichissement par l'effet de la dilution. Ainsi, la reprise des TAG au 6<sup>ème</sup> jour laisse penser qu'on pourrait atteindre les valeurs escomptées au bout de deux semaines au lieu de dix jours. Cependant, les proportions d'acides gras polyinsaturés ont plus que doublé dans l'ensemble pour *Chaetoceros gracilis* avec notamment celle de l'EPA qui a

quadruplé au terme de la carence nutritionnelle en silicates. *Thalassiosira pseudonana* n'a pas donné les résultats escomptés, ce qui pose la question sur le choix des espèces qui répondent le mieux à l'enrichissement. A ce propos, il serait aussi intéressant de tester d'autres diatomées ou mêmes d'autres espèces de microalgues appartenant à des classes comme les Prymnésiophyceae ou les Eustigmatophyceae qui sont largement utilisées dans les écloséries. L'extraction de co-produits à haute valeur ajoutée comme l'astaxanthine s'est révélée faisable. A ce propos, Chgra a été testé et une valeur de 0,21 mg/g MS d'astaxanthine a été trouvée. Cette valeur pourrait être améliorée en allongeant la durée du stress qui n'était que de 18h.

D'une manière générale, l'enrichissement des microalgues en acides gras polyinsaturés peut être d'un apport considérable pour l'aquaculture du fait que l'amélioration de la qualité nutritionnelle de celles-ci telle qu'évoquée dans les chapitres précédents, a des effets positifs sur la qualité des œufs ainsi que sur la croissance et la survie larvaires.

#### **4.2 Conclusion générale**

Les lipides et plus particulièrement les acides gras polyinsaturés qui sont connus pour leurs propriétés nutritionnelles essentielles pour les larves d'organismes marins, proviennent des microalgues. Comme nourriture, les microalgues sont généralement présentées sous forme vivante ou en pâte. Beaucoup d'études ont démontré la piètre qualité nutritionnelle des pâtes de microalgues pour beaucoup d'espèces. En conséquence, les microalgues vivantes représentent la seule nourriture fiable pour le bon fonctionnement des écloséries. Cependant, les coûts associés à la production algale, les risques de contamination de même que les variations temporelles de la qualité des

microalgues sont autant de difficultés qui entravent le développement des écloseries. Par conséquent, la solution viendrait vraisemblablement de la mise en œuvre de structures centralisées de production de microalgues dotées d'une capacité de production suffisante et d'une technologie appropriée qui puissent garantir aux aquaculteurs, la disponibilité de microalgues fiables et de haute qualité nutritionnelle.

Au regard de ce qui précède et en raison de la part importante de la nutrition dans les charges d'exploitation d'une écloserie, l'utilisation de microalgues riches en acides gras polyinsaturés qui améliorent la survie et la croissance des larves, pourrait constituer une alternative pour maintenir une production économiquement viable.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aaron A. E. et C.W. Laidley, 2006. Microalgae production for aquaculture in Hawaii and the U.S. affiliated Pacific Islands. Regional Notes, *Center for Tropical and Subtropical Aquaculture*, vol. 17, n°4. ISSN: 1053-590X.
- Ben Amotz A., Tornabene T.G. et W.H. Thomas, 1985. Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. *Journal of Phycology* 21, 72-81.
- Bennedsen M., X. Wang, R. Willén, T. Wadström et L.P. Andersen, 1999. Treatment of *H. pylori* infected mice with antioxidant astaxanthin reduces gastric inflammation bacterial load and modulates cytokine release by splenocytes. *Immunology Letters* 70, 185-189.
- Borowitzka M.A, 1997. Microalgae for Aquaculture: Opportunities and Constraints. *Journal of Applied Phycology*, 9, 393-401.
- Bromage N., M. Bruce, N. Basavaraja, K. Rana, R. Shields, C. Young, J. Dye, P. Smith, M. Gillespie, et J. Gamble, 1994. Egg quality determinants in fish: the role of overripening with special timing of stripping in the Atlantic Halibut *Hippoglossus hippoglossus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 25, 13-21.
- Brown M.R., S.W. Jeffrey et C.D. Garland, 1989. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture, a literature review. *CSIRO Marine Laboratories Report* 205, 44 pp.
- Brown M.R., S.W. Jeffrey, J.K. Volkman, G.A. Dunstan, 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151:315-331.
- Cahu C., J.Z. Infante, T. Takeuchi, 2003. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture* 227:245-258.

- Capelle E., 2008. National Collaborative Research Infrastructure Strategy (NCRIS) *SARDI Biofuels*.
- Carvalho A.P. and F.X. Malcata, 2004. Optimization of  $\alpha$ -3 Fatty Acid Production by Microalgae: Crossover Effects of CO<sub>2</sub> and Light Intensity under Batch and Continuous Cultivation Modes. *Marine Biotechnology*, Online publication.
- Chen I.S., C.S.J. Shen et A.J. Sheppard, 1981. Comparison of methylene chloride and chloroform for the extraction of fats from food products. *Journal of American Oil Chemist's Society* 58:599-601.
- Cohen Z., 1986. Products from microalgae. In *Handbook of microalgal mass culture*, Ed. A Richmond, CRC Press, Florida, 421-454.
- Cohen Z., 1999. Chemicals from microalgae. *Ed. CRC Press*, ISBN 0748405151, 9780748405152.
- Coutteau P. et P. Sorgeloos, 1992. The use of algal substitutes and requirements of live algae in the hatchery and nursery rearing bivalve molluscs: an international survey. *Journal of Shellfish Resources* 11, 467-476.
- Croci L., L. Cozzi, E. Ciccaglioni, L. Toti, A. Milandri, A. Ceredi, M. Benzi, et R. Pellotti, 2006. Characterization of microalgae bacteria collected from shellfish harvesting areas. *Harmful Algae*, 5 (3), 266-274.
- Di Mascio P., M.E. Murphy et H. Sies, 1991. Antioxidant defense systems, the role of carotenoids, tocopherols and thiols. *American Journal of Clinical Nutrition* 53, 194S-200S.

- Donaldson J., 1991. Commercial production of microalgae at Coast Oyster Company. In Rotifer and microalgae culture systems. *Proceeding of US-Asia Workshop*, Honolulu, HI, 229-236.
- D'Souza F.M.L., R.M. Knuckey, S. Hohmann et R.C. Pendrey, 2002. Flocculated microalgae concentrates as diets for larvae of the tiger prawn *Penaeus monodon Fabricius*. *Aquaculture Nutrition* 8:113-120.
- Duerr E.O., A. Molnar et V. Sato, 1998. Cultured microalgae as aquaculture feeds. *Journal of Marine Biotechnology* 7, 65-70.
- Dunstan G.A., J.K. Volkman, S.M. Barrett et C.D. Garland, 1993. Changes in the lipid composition and maximisation of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture. *Journal of Applied Phycology* 5, 71-83.
- Enright C.T., G.F. Newkirk, J.S. Craigie et J.D. Castell, 1986a. Evaluation of phytoplankton as diets for juvenile *Ostrea edulis* L. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 96, 1-13.
- Enright C.T., G.F. Newkirk, J.S. Craigie et J.D. Castell, 1986b. Growth of juvenile *Ostrea edulis* L. fed *Chaetoceros gracilis* Schütt of varied chemical composition. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 96, 15-26.
- Falkowski, P., R. Barber et V. Smetacek, 1998. Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. *Science*, 281, 200-205.
- FAO, 2006. Rapport sur la situation mondiale des pêches et de l'aquaculture (SOFIA). ISBN 9789252055686, Rome, 180 pp.
- Galli C., 1999. Health implications of DHA. *Pharmaceutical Research* Vol.40, n°3, Article n° phrs.1999.0493.

- Gill, I. et R. Valvety, 1997. Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications. *Trends in Biotechnology*. 15, 401-409.
- Griffith G.W., M.A. Kenslow et L.A. Ross, 1973. A mass culture method for *Tetraselmis sp.* - A promising food for larval crustaceans. Proc. Ann. Meet. *World Mariculture Society* 4, 289-294.
- Guillard R.R.L., 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith W.L., M.H. Chanley, (eds) *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York, 29-60.
- Harker M., A.J. Tsavalos et A.J. Young, 1996. Factors responsible for astaxanthin formation in the chlorophyte *haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology* 55, 207-214.
- Harel M. et W. Koven, 2002. Dietary Arachidonic Acid enhances egg hatchability, larval stress resistance and immune functions in aquatic animals. *VI International Symposium in Aquatic Nutrition, Cancun, Mexico* (September 3-6, 2002).
- Hart H. et J.M. Conia, 2000. *Introduction à la chimie organique*. Édition Dunod, Paris, 2000 ISBN 2100053612, 567 pp.
- Heasman M., J. Diemar, W. O'Connor, T. Sushames and L. Foulkes, 2000. Development of shelf-life extended microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve molluscs- a summary. *Aquaculture Research*, 31, 637-659.

- Heasman M., T.M. Sushames, J.A. Diemar, W.A. O'Connor et L.A. Foulkes, 2001. Production of microalgal concentrates for Aquaculture Part 2. Development and Evaluation of Harvesting, Preservation, Storage and Feeding Technology. *NSW Fisheries Final Report Series* N° 34 ISSN 1440-3544.
- Helm M. et N. Bourne, 2004. Hatchery culture of Bivalves. *FAO Fisheries Technical Paper* 471. Rome FAO, 177 pp.
- Holub B., 2002. Cardiovascular Benefits of Omega-3 Fats. *Canadian Medical Association Journal* 166, 608-615.
- Jeffrey S.W., 2001. From microalgae to fish, the art of husbandry in *Academy Symposium*, November 2001.
- Jyonuchi H., L. Zhang, M. Gross et Y. Tomita, 1994. Immunomodulating action of carotenoids; enhancement of in vivo and in vitro antibody production to T-dependent antigen. *Nutrition and Cancer* 21(1), 47:58.
- Kirk E.A. et P.W. Behrens, 1999. Commercial development in microalgal biotechnology. *Journal of Phycology*, 35, 215-226.
- Knuckey R.M., 1998. Isolation of Australian Microalgae and Preparation of Microalgal Concentrates for use as Aquaculture Feeds. *PhD Thesis University of Tasmania*, December 1998, 254 pp.
- Knuckey R.M., M.R. Brown, R. Robert et D.M.F. Frampton, 2006. Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. *Aquaculture Engineering* 35:300-313.
- Kurashige M., E. Okimasu, M. Inoue et K. Utsumi, 1990. Inhibition of oxidative injury of biological membranes by asthaxanthin. *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR* 22, 27:38.

- Lavens P. et P. Sorgeloos, 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. *FAO Fisheries Technical Paper* 361, 295pp.
- Langdon, C.J et M.J. Waldock, 1981. The effect of algal and artificial diets on the growth and the fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 61, 431-448.
- Lepage G. et C.C. Roy, 1984. Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *Journal of Lipid Research*, 25 (12), 1391-1396.
- Lombardi A.T. et P.J. Wangersky, 1991. Influence of phosphorus and silicon on lipid class production by the marine diatom *Chaetoceros gracilis* grown in turbidostat cage cultures. *Marine Ecology Progress Series* 77, 39-47.
- Lubzens E., O. Gibson, O. Zmora et A. Sukenik, 1995. Potential advantages of frozen algae (*Nannochloropsis* sp.) for rotifer (*Brachionus plicatilis*) culture. *Aquaculture* 133, 295-309.
- Molina G.E., J.A. Sánchez Pérez, F. García Camacho, F.G. Acién Fernández, D. López Alonso et S. Del Castillo, C.I, 1994. Preservation of the marine microalga, *Isochrysis galbana*: influence on the fatty acid profile. *Aquaculture* 123, 377-385.
- Muller-Feuga A., 1997. Microalgues marines, les enjeux de la recherche. *Rapport Ifremer* n° 1092 ISSN 1279-8339 ISBN 2-905434-82-1.
- Muller-Feuga, Arnaud, 2000. The role of microalgae in aquaculture: Situation and Trends. *Journal of Applied Phycology*, 12, 527-534.

- Nell J.A. et W.A. O'Connor, 1991. The evaluation of fresh algae and stored algal concentrates as food source for Sydney Rock Oyster, *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley), larvae. *Aquaculture*, 99, 277-284.
- Nevejan N., V. Courtens, M. Hauva, G. Gajardo, P. Sorgeloos, 2003. Effect of lipid emulsions on production and fatty acid composition of eggs of the scallop *Argopecten purpuratus*. *Marine Biology* 143:327-338.
- Nicolas J.L., S. Corre, et J.C. Cochard, 2004. Bacterial population association with phytoplankton cultured in bivalve hatchery. *Microbial Ecology*, 48, 400-413.
- Okauchi M., M. Kobayashi et Y. Mizukami, 1995. Water quality management by unicellular algae in shrimp larviculture ponds. *U.S.-Japan Cooperative Program in Natural Resources (UJNR) Technical Report*, 24, 59-64.
- Olivo E., 2007. Conception et étude d'un photobioréacteur pour la production en continu de microalgues en écloséries aquacoles. *Thèse de doctorat*, Ecole Doctorale mécanique, thermique et génie civil de Nantes 2007, 259 pp.
- Parrish C., 1987. Separation of aquatic lipid classes by chromarod thin-layer chromatography with measurement by Iatroscan Flame Ionization detection. *Canadian Journal Fish Aquatic Sciences* 44:722-731.
- Pernet F., R. Tremblay, E. Demers et M. Roussy, 2003. Variation of lipid class and fatty acid composition of *Chaetoceros muelleri* and *Isochrysis sp.* grown in a semi continuous system. *Aquaculture*, 221, 393-406.
- Pernet F. et R. Tremblay, 2004. Effect of varying levels of dietary essential fatty acid during early ontogeny of the sea scallop *Placopecten magellanicus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 310, 73-86.

- Pernet F., V. M. Bricelj et S. Cartier, 2006. Lipid class dynamics during larval ontogeny of sea scallop *Placopecten magellanicus* in relation to metamorphic success and response to antibiotics. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 329, 265-280.
- Pillay T.V.R., 1990. Nutrition and feeds. In *Aquaculture principles and practices*. Ed. T.V.R. Pillay, Fishing News Books, Cambridge, 92-155.
- Powell E.N., E.A. Bochenek, J.M. Klinck et E.E. Hofmann, 2002. Influence of food quality and quantity on the growth and development of *Crassostrea gigas* larvae: a modeling approach. *Aquaculture* 210:89-117.
- Regunathan C. et S.G. Wesley, 2004. Control of *Vibrio sp.* in shrimp hatcheries using the green algae *Tetraselmis suecica*. *Asian Fisheries Sciences*, 17, 147-158.
- Riemann B.E.F, J.C. Lewin et B.E. Volcani, 1965. Studies on the biochemistry and fine structure of silica shell formation in diatoms. I. The structure of the cell wall of *Cylindrotheca fusiformis*. Riemann and Lewin, *Journal of Cellular Biology*. 24, 39-55.
- Reitan K.I., J.R. Rainuzzo, G. Oie et Y. Olsen, 1993. Nutritional effects of algal addition in first-feeding of turbot (*Scophthalmus maximus L.*) larvae. *Aquaculture* 118:257-275.
- Reitan K.I., J.R. Rainuzzo, G. Oie et Y. Olsen, 1997. A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae. *Aquaculture* 155:207-221.

- Renaud S.M, D.L. Parry, L.V. Thinh, 1994. Microalgae for use in tropical aquaculture I: Gross chemical and fatty acid composition of twelve species of microalgae from the Northern Territory, Australia. *Journal of Applied Phycology* 6:337-345.
- Robert R. et P. Trintignac , 1997. Substitutes for live microalgae in mariculture: a review. *Aquatic Living Resources* 10:315-327.
- Rocha Rui J., L. Ribeiro, R. Costa et T. Dinis, 2008. Does the presence of microalgae influence fish larvae prey capture? *Aquaculture Research*, 39, 363-369.
- Sahin T. et C. Ustundag, 2003. Effects of different rearing systems on survival rate of hatchery reared black sea Turbot, *Scophthalmus maximus*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatics Sciences*, 3, 25-27.
- Sainz-Hernández J.C. et A. N. Maeda-Martínez, 2005. Source of *Vibrio* bacteria in mollusc hatcheries and control methods: a case study. *Aquaculture Research*, 36, 1611-1618.
- Sargent J., L. McEvoy, A. Estevez, G. Bell, M. Bell, J. Henderson, D. Tocher, 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture* 179:217-229.
- Sargent J.R., D.R. Tocher, J.G. Bell, 2002. The lipids. In: Halver J.E., R.W. Hardy (eds) *Fish nutrition*. Academic Press, Amsterdam, p 181-255.
- Scala S. et C. Bowler, 2001. Molecular insights into the novel aspects of diatom biology. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, vol. 58, 11.

- Seychelles L.H., 2008. Effets de l'apport alimentaire en acides gras sur les communautés bactériennes associées aux larves de plie rouge *Pseudopleuronectes americanus*. Thèse de doctorat présentée à l'Université du Québec à Rimouski, 163 pp.
- Shifrin N. S. et S.W. Chisholm, 1981. Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects on nitrate, silicate and light-dark cycles. *J. Phycol.* 17, 3, 74-84.
- Soudant P., Chu F.L. et J.F Samain, 2000. Lipids requirements in some economically important marine bivalves. *Journal of Shellfish Resources* 19:605.
- Soudant P., Y. Marty, J. Moal, H. Masski, et J.F. Samain, 1998. Fatty acid composition of polar lipid classes during larval development of scallop *Pecten maximus* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology* 121A, 279-288.
- Stillwell W. et S. R. Wassal, 2003. Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acids. *Chemistry and Physics of Lipids* 126, 1-27.
- Tadashi M., H. Takeyama, H. Miyashita et H. Yokouchi, 2005. Marine Microalgae. *Adv. Biochem Engin/Biotechnol*, 96: 165–188.
- Taguchi S., J.A. Hirata et E.A. Laws, 1987. Silicate deficiency and lipid synthesis of marine diatoms. *Journal of Phycology* 23, 260-267.
- Tanaka T., H. Makita, M. Ohnishi, Y. Hirose, A. Wang, H. Mori, K. Sato, A. Hara et H. Ogawa, 1994. Chemoprevention of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced oral carcinogenesis by dietary curcumin and hesperidin. Comparison with the protective effect of beta-carotene. *Cancer Research*. 54, 4653-4659.

- Thonon T., D. Harvey, T.R. Larson et I.A. Graham, 2002. Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. *Phytochemistry*, 61, 15-24.
- Tso M.O.M. et T.T. Lam, 1996. Method of retarding and ameliorating central nervous system and eye damage, US patent n° 5527533, *Board of trustees of the University of Illinois*, United States of America.
- Tredici M., 2004. Mass production of microalgae: photobioreactor. In *handbook of microalgal cultures, biotechnology and applied phycology* (Richmond, A. Ed.), 178-214. Blackwell, Oxford, UK.
- Tremblay R., S. Cartier, P. Miner, F. Pernet, C. Quéré, J. Moal, M.L. Muzellec, M. Mazuret et J.F. Samain, 2007. Effect of *Rhodomonas salina* addition to a standard hatchery diet during the early ontogeny of the scallop *Pecten maximus*. *Aquaculture* 262:410-418.
- Voet D. et J.G. Voet, 2005. *Biochimie* 2<sup>ème</sup> Ed. De Boeck, Paris, 1583 pages.
- Volkman J.K., S.W. Jeffrey, P.D. Nichols, G.I. Rogers et C.D. Garland, 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 128:219-240.
- Volkman J.K., G.A. Dunstan, S.W. Jeffrey et P.S. Kearney, 1991. Fatty acids from microalgae of the genus *Pavlova*. *Phytochemistry*, 30, 6:1855-1859.
- Watanabe T., C. Kitajima et S. Fujita, 1983. Nutritional values of live food organisms used in Japan for mass propagation of fish. A review. *Aquaculture* 34, 115-143.
- Watson R.H., G.G. Jones and B.L. Jones, 1986. Using centrifuged algae for feeding oyster larvae. *Journal of Shellfish Resources*, 5:136.

- Webb K.L. et F.E. Chu, 1983. Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. In *Proceeding of the second International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition*, October 27-29, 1981 Lewes/Rehoboth Beach, Delaware. Eds G.D. Pruder, C.J. Langdon and D.E. Conklin, Louisiana State University, Division of Continuing Education, 272:291.
- Weil J.H., 1990. *Biochimie générale* 6<sup>ème</sup> Ed. Masson, Paris, 546 pages.
- Wijffels R.H., 2008. Potential of sponges and microalgae for marine biotechnology. *Trends in biotechnology*, 26 (1), 26-31.
- Whyte J.N.C., N. Bourne et C.A. Hodgson, 1990. Nutritional Conditions of Rock Scallop, *Crassadoma gigantea* (Gray), larvae fed mixed algal diets. *Aquaculture*, 86, 25-40.
- Zhukova N.V., 2004. Changes in the lipid composition of *Thalassiosira pseudonana* during its life cycle. *Russian Journal of Plant Physiology* 51, 5, 702-707.

Rapport-Gratuit.com

ANNEXES

Annexe 1 : Manova des grandes classes de lipides pour le concentré de *Nannochloropsis occulata*.

Tests of Between-Subjects Effects						
Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	TAG	205.365(a)	19	10.809	1.184	.366
	ST	15.486(b)	19	.815	1.739	.128
	AMPL	1315.817(c)	19	69.254	.996	.507
	PL	2292.441(d)	19	120.655	.755	.724
Intercept	TAG	21211.483	1	21211.483	2323.833	.000
	ST	14.641	1	14.641	31.240	.000
	AMPL	47789.125	1	47789.125	687.560	.000
	PL	39704.699	1	39704.699	248.534	.000
Traitement	TAG	.804	1	.804	.088	.770
	ST	.594	1	.594	1.267	.276
	AMPL	83.570	1	83.570	1.202	.288
	PL	.300	1	.300	.002	.966
Temps	TAG	142.614	9	15.846	1.736	.157
	ST	9.533	9	1.059	2.260	.071
	AMPL	705.472	9	78.386	1.128	.396
	PL	1619.994	9	179.999	1.127	.397
Traitement * Temps	TAG	66.845	9	7.427	.814	.611
	ST	5.320	9	.591	1.261	.325
	AMPL	403.490	9	44.832	.645	.745
	PL	569.890	9	63.321	.396	.920
Error	TAG	155.173	17	9.128		
	ST	7.967	17	.469		
	AMPL	1181.592	17	69.505		
	PL	2715.842	17	159.755		
Total	TAG	22721.078	37			
	ST	38.531	37			
	AMPL	52652.613	37			
	PL	48817.337	37			
Corrected Total	TAG	360.538	36			
	ST	23.454	36			
	AMPL	2497.409	36			
	PL	5008.284	36			

a R Squared = .570 (Adjusted R Squared = .089)

b R Squared = .660 (Adjusted R Squared = .281)

c R Squared = .527 (Adjusted R Squared = -.002)

d R Squared = .458 (Adjusted R Squared = -.148)

Annexe 2: Manova des acides gras pour le concentré de *Nannochloropsis occulata*

## General Linear Model

Multivariate Tests(c)						
Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	.986	364.226(a)	3.000	16.000	.000
	Wilks' Lambda	.014	364.226(a)	3.000	16.000	.000
	Hotelling's Trace	68.292	364.226(a)	3.000	16.000	.000
	Roy's Largest Root	68.292	364.226(a)	3.000	16.000	.000
traitement	Pillai's Trace	.049	.276(a)	3.000	16.000	.842
	Wilks' Lambda	.951	.276(a)	3.000	16.000	.842
	Hotelling's Trace	.052	.276(a)	3.000	16.000	.842
	Roy's Largest Root	.052	.276(a)	3.000	16.000	.842
temps	Pillai's Trace	1.327	1.587	27.000	54.000	.074
	Wilks' Lambda	.145	1.642	27.000	47.371	.067
	Hotelling's Trace	3.117	1.693	27.000	44.000	.059
	Roy's Largest Root	2.168	4.337(b)	9.000	18.000	.004
traitement * temps	Pillai's Trace	.691	.599	27.000	54.000	.925
	Wilks' Lambda	.448	.556	27.000	47.371	.948
	Hotelling's Trace	.945	.513	27.000	44.000	.966
	Roy's Largest Root	.475	.950(b)	9.000	18.000	.509
a Exact statistic						
b The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.						
c Design: Intercept+traitement+temps+traitement * temps						

## Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	T AA	.024(a)	19	.001	.953	.542
	T EPA	.137(b)	19	.007	.972	.525
	T DHA	.086(c)	19	.005	2.321	.040
Intercept	T AA	1.537	1	1.537	1180.974	.000
	T EPA	8.604	1	8.604	1156.861	.000
	T DHA	.022	1	.022	11.083	.004
traitement	T AA	.001	1	.001	.738	.401
	T EPA	.006	1	.006	.777	.390
	T DHA	.000	1	.000	.252	.622
temps	T AA	.012	9	.001	.997	.476
	T EPA	.067	9	.007	1.002	.473
	T DHA	.075	9	.008	4.260	.004
traitement * temps	T AA	.010	9	.001	.886	.555
	T EPA	.061	9	.007	.911	.537
	T DHA	.011	9	.001	.607	.775
Error	T AA	.023	18	.001		
	T EPA	.134	18	.007		
	T DHA	.035	18	.002		
Total	T AA	1.636	38			
	T EPA	9.159	38			
	T DHA	.147	38			
Corrected Total	T AA	.047	37			
	T EPA	.271	37			
	T DHA	.121	37			

a R Squared = .501 (Adjusted R Squared = -.025)

b R Squared = .507 (Adjusted R Squared = -.014)

c R Squared = .710 (Adjusted R Squared = .404)

Annexe 3 : Manova des grandes classes de lipides pour les concentrés de *T-iso*, *Mono* et du mix (*T-iso*, *Mono*, *Nanno*).

## General Linear Model (T-iso)

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	%M TAG	162.777(a)	8	20.347	1.953	.169
	%M ST	.429(b)	8	.054	.889	.560
	%M AMPL	670.769(c)	8	83.846	2.539	.093
	%M PL	250.001(d)	8	31.250	2.344	.113
Intercept	%M TAG	1630.902	1	1630.902	156.564	.000
	%M ST	.114	1	.114	1.885	.203
	%M AMPL	8106.959	1	8106.959	245.490	.000
	%M PL	54934.690	1	54934.690	4120.192	.000
jour	%M TAG	162.777	8	20.347	1.953	.169
	%M ST	.429	8	.054	.889	.560
	%M AMPL	670.769	8	83.846	2.539	.093
	%M PL	250.001	8	31.250	2.344	.113
Error	%M TAG	93.752	9	10.417		
	%M ST	.543	9	.060		
	%M AMPL	297.212	9	33.024		
	%M PL	119.997	9	13.333		
Total	%M TAG	1887.430	18			
	%M ST	1.086	18			
	%M AMPL	9074.940	18			
	%M PL	55304.688	18			
Corrected Total	%M TAG	256.529	17			
	%M ST	.972	17			
	%M AMPL	967.981	17			
	%M PL	369.998	17			
a R Squared = .635 (Adjusted R Squared = .310)						
b R Squared = .442 (Adjusted R Squared = -.055)						
c R Squared = .693 (Adjusted R Squared = .420)						
d R Squared = .676 (Adjusted R Squared = .387)						

## General Linear Model (Mono)

Tests of Between-Subjects Effects						
Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	%M TAG	373.266(a)	8	46.658	1.701	.222
	%M ST	371.743(b)	8	46.468	1.896	.180
	%M AMPL	122.726(c)	8	15.341	.212	.980
	%M PL	5662.140(d)	8	707.768	1.677	.228
Intercept	%M TAG	1777.411	1	1777.411	64.798	.000
	%M ST	3825.784	1	3825.784	156.127	.000
	%M AMPL	8486.248	1	8486.248	117.195	.000
	%M PL	15501.573	1	15501.573	36.735	.000
jour	%M TAG	373.266	8	46.658	1.701	.222
	%M ST	371.743	8	46.468	1.896	.180
	%M AMPL	122.726	8	15.341	.212	.980
	%M PL	5662.140	8	707.768	1.677	.228
Error	%M TAG	246.870	9	27.430		
	%M ST	220.539	9	24.504		
	%M AMPL	651.701	9	72.411		
	%M PL	3797.872	9	421.986		
Total	%M TAG	2397.547	18			
	%M ST	4418.066	18			
	%M AMPL	9260.675	18			
	%M PL	24961.586	18			
Corrected Total	%M TAG	620.136	17			
	%M ST	592.282	17			
	%M AMPL	774.427	17			
	%M PL	9460.012	17			
a R Squared = .602 (Adjusted R Squared = .248)						
b R Squared = .628 (Adjusted R Squared = .297)						
c R Squared = .158 (Adjusted R Squared = -.590)						
d R Squared = .599 (Adjusted R Squared = .242)						

## General Linear Model (Mix)

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	%M TAG	1350.666(a)	8	168.833	2.700	.080
	%M ST	14.845(b)	8	1.856	.690	.694
	%M AMPL	984.504(c)	8	123.063	2.107	.144
	%M PL	2182.941(d)	8	272.868	.569	.780
Intercept	%M TAG	16862.903	1	16862.903	269.707	.000
	%M ST	278.357	1	278.357	103.489	.000
	%M AMPL	5261.788	1	5261.788	90.075	.000
	%M PL	21402.343	1	21402.343	44.665	.000
jour	%M TAG	1350.666	8	168.833	2.700	.080
	%M ST	14.845	8	1.856	.690	.694
	%M AMPL	984.504	8	123.063	2.107	.144
	%M PL	2182.941	8	272.868	.569	.780
Error	%M TAG	562.708	9	62.523		
	%M ST	24.208	9	2.690		
	%M AMPL	525.741	9	58.416		
	%M PL	4312.586	9	479.176		
Total	%M TAG	18776.277	18			
	%M ST	317.410	18			
	%M AMPL	6772.034	18			
	%M PL	27897.869	18			
Corrected Total	%M TAG	1913.374	17			
	%M ST	39.053	17			
	%M AMPL	1510.246	17			
	%M PL	6495.527	17			
a R Squared = .706 (Adjusted R Squared = .444)						
b R Squared = .380 (Adjusted R Squared = -.171)						
c R Squared = .652 (Adjusted R Squared = .342)						
d R Squared = .336 (Adjusted R Squared = -.254)						

## Annexe 4 : MANOVA des acides gras pour le concentré de T-iso

```

GET DATA /TYPE=XLS
  /FILE='C:\Users\Ta Aida DIOUF\Desktop\AG_Tiso.xls'
  /SHEET=name 'Feuill1'
  /CELLRANGE=full
  /READNAMES=on
  /ASSUMEDSTRWIDTH=32767.
DATASET NAME DataSet1 WINDOW=FRONT.
GLM
  AA EPA DHA saturés MUFA PUFA BY temps
  /METHOD = SSTYPE(3)
  /INTERCEPT = INCLUDE
  /POSTHOC = temps ( TUKEY )
  /EMMEANS = TABLES(temps)
  /PRINT = DESCRIPTIVE HOMOGENEITY
  /CRITERIA = ALPHA(.05)
  /DESIGN = temps .

```

**General Linear Model**

Multivariate Tests(c)

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	1,000	2728,142a	6,000	4,000	,000
	Wilks' Lambda	,000	2728,142a	6,000	4,000	,000
	Hotelling's Trace	4092,213	2728,142a	6,000	4,000	,000
	Roy's Largest Root	4092,213	2728,142a	6,000	4,000	,000
temps	Pillai's Trace	3,759	1,886	48,000	54,000	,012
	Wilks' Lambda	,000	2,218	48,000	23,744	,019
	Hotelling's Trace	33,797	1,643	48,000	14,000	,156
	Roy's Largest Root	20,053	22,560b	8,000	9,000	,000

a Exact statistic

b The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

c Design: Intercept+temps

## Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	%AA	,122(a)	8	,015	,736	,662
	%EPA	1,960(b)	8	,245	9,622	,001
	% DHA	58,010(c)	8	7,251	4,576	,018
	% saturés	266,577(d)	8	33,322	2,023	,157
	% MUFA	32,469(e)	8	4,059	3,526	,039
	% PUFA	121,254(f)	8	15,157	1,058	,463
Intercept	%AA	5,515	1	5,515	265,755	,000
	%EPA	21,893	1	21,893	859,955	,000
	% DHA	2872,568	1	2872,568	1812,734	,000
	% saturés	20657,390	1	20657,390	1254,296	,000
	% MUFA	3497,366	1	3497,366	3038,046	,000
	% PUFA	13306,931	1	13306,931	928,843	,000
temps	%AA	,122	8	,015	,736	,662
	%EPA	1,960	8	,245	9,622	,001
	% DHA	58,010	8	7,251	4,576	,018
	% saturés	266,577	8	33,322	2,023	,157
	% MUFA	32,469	8	4,059	3,526	,039
	% PUFA	121,254	8	15,157	1,058	,463
Error	%AA	,187	9	,021		
	%EPA	,229	9	,025		
	% DHA	14,262	9	1,585		
	% saturés	148,224	9	16,469		
	% MUFA	10,361	9	1,151		
	% PUFA	128,937	9	14,326		
Total	%AA	5,824	18			
	%EPA	24,082	18			
	% DHA	2944,840	18			
	% saturés	21072,192	18			
	% MUFA	3540,196	18			
	% PUFA	13557,122	18			
Corrected Total	%AA	,309	17			
	%EPA	2,189	17			
	% DHA	72,272	17			
	% saturés	414,801	17			
	% MUFA	42,829	17			
	% PUFA	250,191	17			

a R Squared = ,396 (Adjusted R Squared = -,142)

b R Squared = ,895 (Adjusted R Squared = ,802)

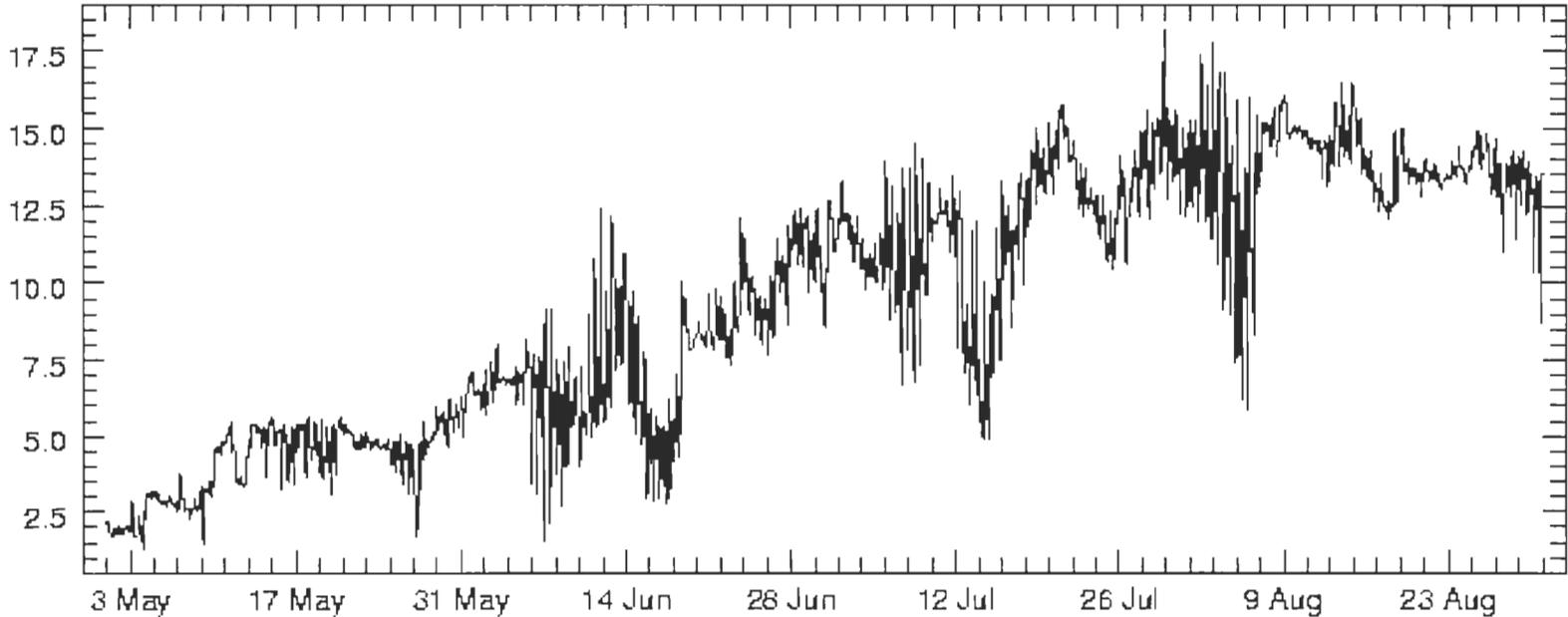
c R Squared = ,803 (Adjusted R Squared = ,627)

d R Squared = ,643 (Adjusted R Squared = ,325)

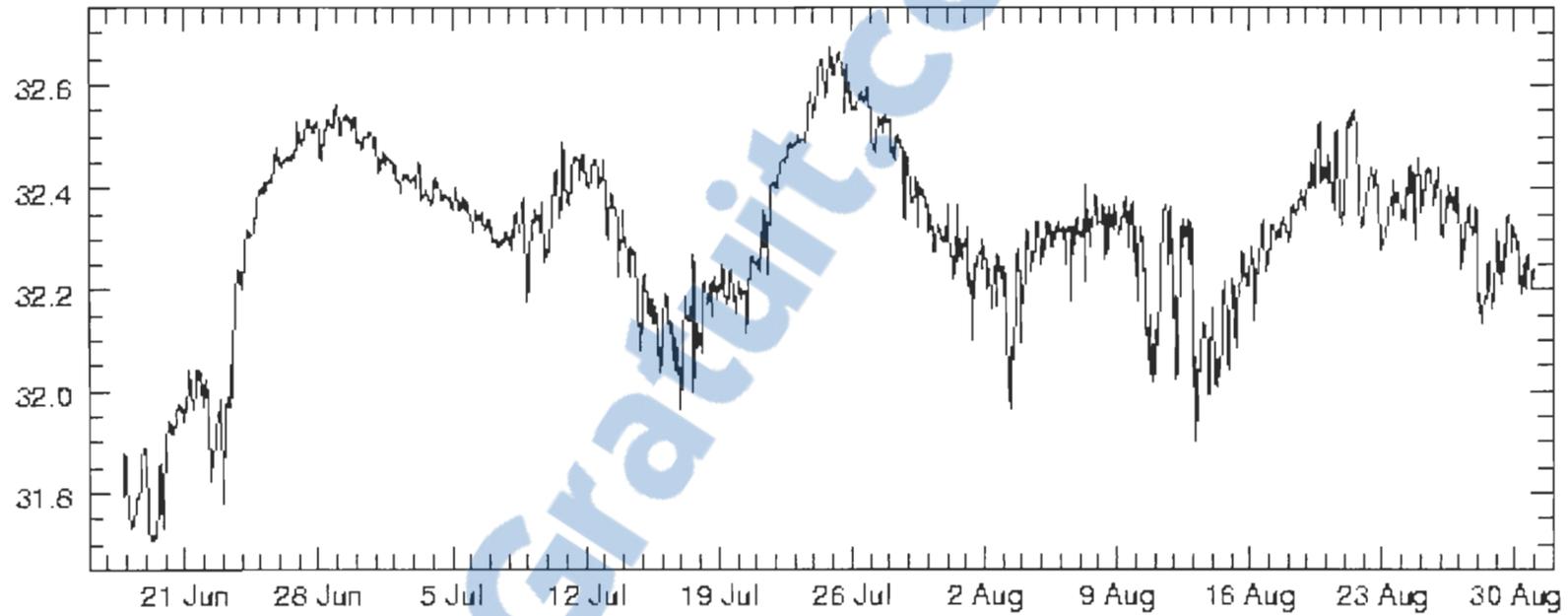
e R Squared = ,758 (Adjusted R Squared = ,543)

f R Squared = ,485 (Adjusted R Squared = ,027)

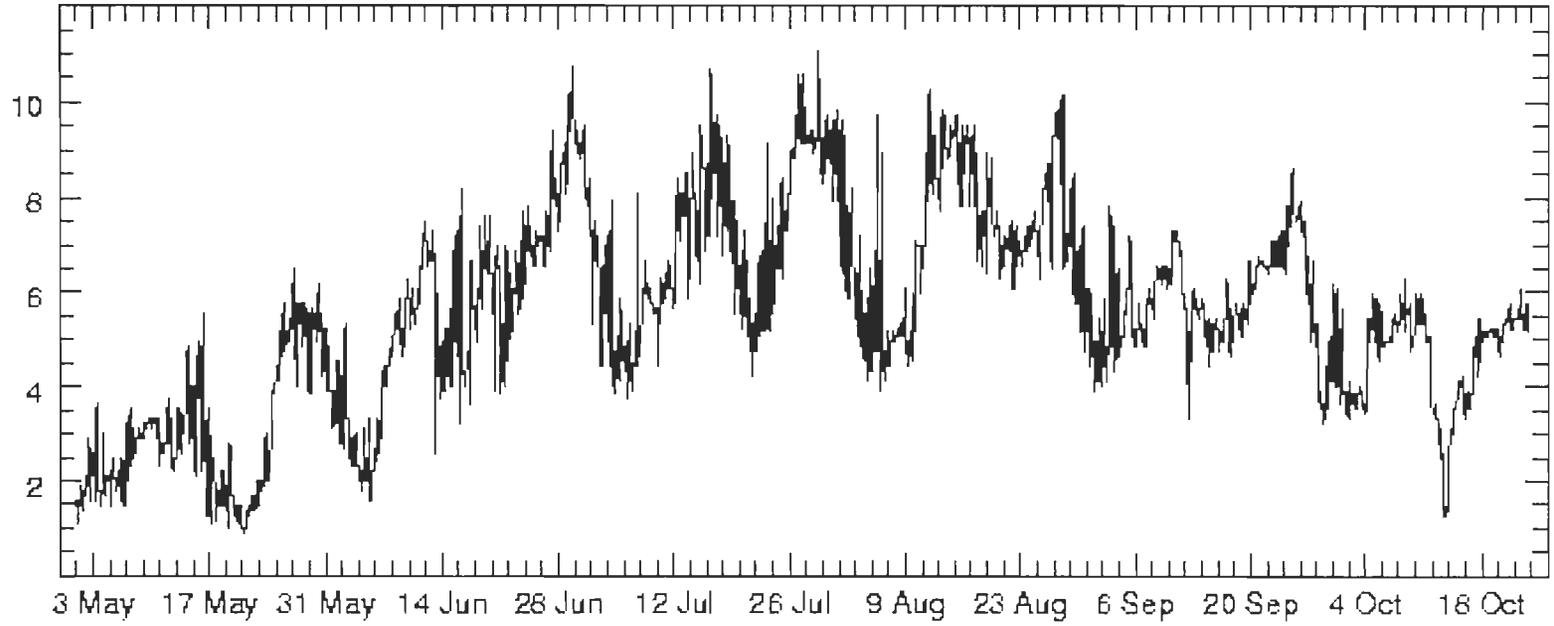
Annexe 5 : Profile de température (°C) à Grande-Rivière durant l'été 2007 à la profondeur de 7 m (source : [www.osl.gc.ca](http://www.osl.gc.ca))



Annexe 6 : Profile de salinité (S‰) à Grande-Rivière durant l'été 2007 à la profondeur de 7 m (source : [www.osl.gc.ca](http://www.osl.gc.ca)).



Annexe 7 : Profile de température pour Rimouski durant l'été et l'automne 2007 à la profondeur de 14 m (source : [www.osl.gc.ca](http://www.osl.gc.ca)).



## Annexe 8: ANOVA compte cellulaire Grande Rivière

```

UNIANOVA
  compte106cml BY traitement tempsh
  /METHOD = SSTYPE(3)
  /INTERCEPT = INCLUDE
  /POSTHOC = traitement tempsh ( TUKEY )
  /PRINT = DESCRIPTIVE HOMOGENEITY
  /CRITERIA = ALPHA(.05)
  /DESIGN = traitement tempsh traitement*tempsh .

```

## Univariate Analysis of Variance

### Between-Subjects Factors

		N
traitement	avec lumière	9
	sans lumière	9
temps (h)	0	6
	18	6
	24	6

### Descriptive Statistics

Dependent Variable: compte10<sup>6</sup>c/ml

traitement	temps (h)	Mean	Std. Deviation	N
avec lumière	0	4.607	.5569	3
	18	4.992	1.3672	3
	24	4.307	.3166	3
	Total	4.635	.8113	9
sans lumière	0	4.682	.7648	3
	18	4.332	.3165	3
	24	4.671	.5496	3
	Total	4.561	.5258	9
Total	0	4.644	.5997	6
	18	4.662	.9583	6
	24	4.489	.4479	6
	Total	4.598	.6643	18

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: compte10<sup>6</sup>/ml

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.969 <sup>a</sup>	5	.194	.356	.869
Intercept	380.587	1	380.587	699.039	.000
traitement	.024	1	.024	.045	.836
tempsh	.109	2	.054	.100	.906
traitement * tempsh	.836	2	.418	.767	.486
Error	6.533	12	.544		
Total	388.089	18			
Corrected Total	7.502	17			

a. R Squared = .129 (Adjusted R Squared = -.234)

Annexe 9: ANOVA compte cellulaire *Chgra* Pointe-au-Père

```
GET DATA /TYPE=XLS
  /FILE='C:\Documents and Settings\DIADIE DIOUF\Mes documents\compte cellu'+
'laire_PAP.xls'
  /SHEET=name 'Feuill1'
  /CELLRANGE=full
  /READNAMES=on
  /ASSUMEDSTRWIDTH=32767.
DATASET NAME DataSet1 WINDOW=FRONT.
UNIANOVA
  comptel06cml BY traitement tempsh
  /METHOD = SSTYPE(3)
  /INTERCEPT = INCLUDE
  /POSTHOC = traitement tempsh ( TUKEY )
  /PRINT = DESCRIPTIVE HOMOGENEITY
  /CRITERIA = ALPHA(.05)
  /DESIGN = traitement tempsh traitement*tempsh .
```

**Univariate Analysis of Variance**

### Between-Subjects Factors

		N
traitement	avec lumière	9
	sans lumière	9
temps (h)	0	6
	18	6
	24	6

### Descriptive Statistics

Dependent Variable: compte 10<sup>6</sup>cf/ml

traitement	temps (h)	Mean	Std. Deviation	N
avec lumière	0	7.917	1.9939	3
	18	8.383	2.2541	3
	24	8.583	2.1554	3
	Total	8.294	1.8744	9
sans lumière	0	7.817	1.9902	3
	18	8.183	2.1073	3
	24	8.217	2.1461	3
	Total	8.072	1.8135	9
Total	0	7.867	1.7826	6
	18	8.283	1.9547	6
	24	8.400	1.9342	6
	Total	8.183	1.7928	18

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: compte 10<sup>6</sup>cf/ml

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1.220 <sup>a</sup>	5	.244	.055	.998
Intercept	1205.405	1	1205.405	270.776	.000
traitement	.222	1	.222	.050	.827
tempsh	.943	2	.472	.106	.900
traitement * tempsh	.054	2	.027	.006	.994
Error	53.420	12	4.452		
Total	1260.045	18			
Corrected Total	54.640	17			

a. R Squared = .022 (Adjusted R Squared = -.385)

Annexe 10: Manova des grandes classes de lipides pour *Chgra*.

## Traitement

## General Linear Model

[DataSet1]

## Warnings

Post hoc tests are not performed for traitement because there are fewer than three groups.
--

## Between-Subjects Factors

		N
traitement	airlift	9
	normal	9

Box's Test of Equality of Covariance Matrices<sup>a</sup>

Box's M	1.954
F	.258
df1	6
df2	1854.792
Sig.	.956

Tests the null hypothesis that the observed covariance matrices of the dependent variables are equal across groups.

a. Design: Intercept+traitement

Multivariate Tests<sup>b</sup>

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	1.000	138665.77 <sup>a</sup>	3.000	14.000	.000
	Wilks' Lambda	.000	138665.77 <sup>a</sup>	3.000	14.000	.000
	Hotelling's Trace	29714.093	138665.77 <sup>a</sup>	3.000	14.000	.000
	Roy's Largest Root	29714.093	138665.77 <sup>a</sup>	3.000	14.000	.000
traitement	Pillai's Trace	.189	1.091 <sup>a</sup>	3.000	14.000	.385
	Wilks' Lambda	.811	1.091 <sup>a</sup>	3.000	14.000	.385
	Hotelling's Trace	.234	1.091 <sup>a</sup>	3.000	14.000	.385
	Roy's Largest Root	.234	1.091 <sup>a</sup>	3.000	14.000	.385

a. Exact statistic

b. Design: Intercept+traitement

Levene's Test of Equality of Error Variances<sup>a</sup>

	F	df1	df2	Sig.
%M TAG	.400	1	16	.536
%M AMPL	.729	1	16	.406
%M PL	1.276	1	16	.275

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept+traitement

## Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	%M TAG	68.075 <sup>a</sup>	1	68.075	.198	.662
	%M AMPL	213.804 <sup>b</sup>	1	213.804	1.820	.196
	%M PL	40.662 <sup>c</sup>	1	40.662	.171	.685
Intercept	%M TAG	19779.459	1	19779.459	57.598	.000
	%M AMPL	10841.986	1	10841.986	92.270	.000
	%M PL	30776.096	1	30776.096	129.104	.000
traitement	%M TAG	68.075	1	68.075	.198	.662
	%M AMPL	213.804	1	213.804	1.820	.196
	%M PL	40.662	1	40.662	.171	.685
Error	%M TAG	5494.476	16	343.405		
	%M AMPL	1880.047	16	117.503		
	%M PL	3814.106	16	238.382		
Total	%M TAG	25342.011	18			
	%M AMPL	12935.836	18			
	%M PL	34630.864	18			
Corrected Total	%M TAG	5562.552	17			
	%M AMPL	2093.851	17			
	%M PL	3854.768	17			

a. R Squared = .012 (Adjusted R Squared = -.049)

b. R Squared = .102 (Adjusted R Squared = .046)

c. R Squared = .011 (Adjusted R Squared = -.051)

## Temps

### General Linear Model

#### Between-Subjects Factors

	N
temps 0	2
(j) 1	2
2	2
3	2
4	2
5	2
7	2
9	2
10	2

#### Multivariate Tests<sup>c</sup>

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	1.000	704851.57 <sup>a</sup>	3.000	7.000	.000
	Wilks' Lambda	.000	704851.57 <sup>a</sup>	3.000	7.000	.000
	Hotelling's Trace	302079.25	704851.57 <sup>a</sup>	3.000	7.000	.000
	Roy's Largest Root	302079.25	704851.57 <sup>a</sup>	3.000	7.000	.000
tempsj	Pillai's Trace	2.115	2.690	24.000	27.000	.007
	Wilks' Lambda	.002	6.696	24.000	20.903	.000
	Hotelling's Trace	45.483	10.734	24.000	17.000	.000
	Roy's Largest Root	34.814	39.166 <sup>b</sup>	8.000	9.000	.000

a. Exact statistic

b. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

c. Design: Intercept+tempsj

## Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	%M TAG	5223.188 <sup>a</sup>	8	652.899	17.315	.000
	%M AMPL	1576.468 <sup>b</sup>	8	197.058	3.428	.042
	%M PL	2861.684 <sup>c</sup>	8	357.710	3.242	.049
Intercept	%M TAG	19779.459	1	19779.459	524.556	.000
	%M AMPL	10841.986	1	10841.986	188.599	.000
	%M PL	30776.096	1	30776.096	278.914	.000
tempstj	%M TAG	5223.188	8	652.899	17.315	.000
	%M AMPL	1576.468	8	197.058	3.428	.042
	%M PL	2861.684	8	357.710	3.242	.049
Error	%M TAG	339.364	9	37.707		
	%M AMPL	517.383	9	57.487		
	%M PL	993.084	9	110.343		
Total	%M TAG	25342.011	18			
	%M AMPL	12935.836	18			
	%M PL	34630.864	18			
Corrected Total	%M TAG	5562.552	17			
	%M AMPL	2093.851	17			
	%M PL	3854.768	17			

a. R Squared = .939 (Adjusted R Squared = .885)

b. R Squared = .753 (Adjusted R Squared = .533)

c. R Squared = .742 (Adjusted R Squared = .513)

Annexe 11 : Manova des grandes classes de lipides pour *Actin*.

## Between-Subjects Factors

		N
temps (j)	0	2
	1	2
	2	2
	3	2
	5	2
	6	2
	7	2
	9	2

Multivariate Tests<sup>c</sup>

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	1.000	17940.648 <sup>a</sup>	3.000	6.000	.000
	Wilks' Lambda	.000	17940.648 <sup>a</sup>	3.000	6.000	.000
	Hotelling's Trace	8970.324	17940.648 <sup>a</sup>	3.000	6.000	.000
	Roy's Largest Root	8970.324	17940.648 <sup>a</sup>	3.000	6.000	.000
tempsj	Pillai's Trace	1.729	1.555	21.000	24.000	.148
	Wilks' Lambda	.051	1.536	21.000	17.779	.182
	Hotelling's Trace	6.184	1.374	21.000	14.000	.274
	Roy's Largest Root	4.017	4.591 <sup>b</sup>	7.000	8.000	.024

a. Exact statistic

b. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

c. Design: Intercept+tempsj

## Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	%M TAG	577.540 <sup>a</sup>	7	82.506	2.266	.137
	%M AMPL	859.421 <sup>b</sup>	7	122.774	.759	.635
	%M PL	1689.141 <sup>c</sup>	7	241.306	1.005	.491
Intercept	%M TAG	1890.115	1	1890.115	51.912	.000
	%M AMPL	18968.991	1	18968.991	117.322	.000
	%M PL	46863.535	1	46863.535	195.266	.000
tempsj	%M TAG	577.540	7	82.506	2.266	.137
	%M AMPL	859.421	7	122.774	.759	.635
	%M PL	1689.141	7	241.306	1.005	.491
Error	%M TAG	291.278	8	36.410		
	%M AMPL	1293.461	8	161.683		
	%M PL	1919.988	8	239.999		
Total	%M TAG	2758.933	16			
	%M AMPL	21121.874	16			
	%M PL	50472.663	16			
Corrected Total	%M TAG	868.818	15			
	%M AMPL	2152.883	15			
	%M PL	3609.129	15			

a. R Squared = .665 (Adjusted R Squared = .371)

b. R Squared = .399 (Adjusted R Squared = -.127)

c. R Squared = .468 (Adjusted R Squared = .003)

## Multivariate Tests

	Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Pillai's trace	1.729	1.555	21.000	24.000	.148
Wilks' lambda	.051	1.536	21.000	17.779	.182
Hotelling's trace	6.184	1.374	21.000	14.000	.274
Roy's largest root	4.017	4.591 <sup>a</sup>	7.000	8.000	.024

Each F tests the multivariate effect of temps (j). These tests are based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

- a. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

## Univariate Tests

Dependent Variable		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
%M TAG	Contrast	577.540	7	82.506	2.266	.137
	Error	291.278	8	36.410		
%M AMPL	Contrast	859.421	7	122.774	.759	.635
	Error	1293.461	8	161.683		
%M PL	Contrast	1689.141	7	241.306	1.005	.491
	Error	1919.988	8	239.999		

The F tests the effect of temps (j). This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Annexe 12 : Manova des acides gras pour *Chgra*.

```

GLM
  AA EPA DHA BY temps
  /METHOD = SSTYPE(3)
  /INTERCEPT = INCLUDE
  /EMMEANS = TABLES(temps)
  /PRINT = DESCRIPTIVE HOMOGENEITY
  /CRITERIA = ALPHA(.05)
  /DESIGN = temps .

```

## General Linear Model

[DataSet1]

## Between-Subjects Factors

		N
temps	0	4
	2	4
	5	4
	10	4

Box's Test of Equality of Covariance Matrices<sup>a</sup>

Box's M	87,658
F	2,499
df1	18
df2	508,859
Sig.	,001

Tests the null hypothesis that the observed covariance matrices of the dependent variables are equal across groups.

a. Design: Intercept+temps

Multivariate Tests<sup>c</sup>

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	.870	22,324 <sup>a</sup>	3,000	10,000	,000
	Wilks' Lambda	.130	22,324 <sup>a</sup>	3,000	10,000	,000
	Hotelling's Trace	6,697	22,324 <sup>a</sup>	3,000	10,000	,000
	Roy's Largest Root	6,697	22,324 <sup>a</sup>	3,000	10,000	,000
temps	Pillai's Trace	1,137	2,439	9,000	36,000	,028
	Wilks' Lambda	,158	3,086	9,000	24,488	,013
	Hotelling's Trace	3,475	3,346	9,000	26,000	,008
	Roy's Largest Root	2,823	11,292 <sup>b</sup>	3,000	12,000	,001

a. Exact statistic

b. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

c. Design: Intercept+temps

Levene's Test of Equality of Error Variances<sup>a</sup>

	F	df1	df2	Sig.
%AA	32,279	3	12	,000
%EPA	36,428	3	12	,000
%DHA	4,188	3	12	,030

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups

a. Design: Intercept+temps

## Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	%AA	50,187(a)	3	16,729	1,145	,370
	%EPA	277,996(b)	3	92,665	1,991	,169
	% DHA	8,519(c)	3	2,840	2,535	,106
	% saturés	1918,195(d)	3	639,398	2,483	,111
	% MUFA	607,753(e)	3	202,584	1,137	,373
	% PUFA	574,710(f)	3	191,570	3,127	,066
Intercept	%AA	441,090	1	441,090	30,199	,000
	%EPA	1463,591	1	1463,591	31,448	,000
	% DHA	66,861	1	66,861	59,686	,000
	% saturés	38084,007	1	38084,007	147,889	,000
	% MUFA	9947,332	1	9947,332	55,833	,000
	% PUFA	7533,082	1	7533,082	122,954	,000
temps	%AA	50,187	3	16,729	1,145	,370
	%EPA	277,996	3	92,665	1,991	,169
	% DHA	8,519	3	2,840	2,535	,106
	% saturés	1918,195	3	639,398	2,483	,111
	% MUFA	607,753	3	202,584	1,137	,373
	% PUFA	574,710	3	191,570	3,127	,066
Error	%AA	175,275	12	14,606		
	%EPA	558,474	12	46,540		
	% DHA	13,443	12	1,120		
	% saturés	3090,215	12	257,518		
	% MUFA	2137,963	12	178,164		
	% PUFA	735,208	12	61,267		
Total	%AA	666,552	16			
	%EPA	2300,062	16			
	% DHA	88,822	16			
	% saturés	43092,417	16			
	% MUFA	12693,049	16			
	% PUFA	8843,001	16			
Corrected Total	%AA	225,462	15			
	%EPA	836,471	15			
	% DHA	21,961	15			
	% saturés	5008,410	15			
	% MUFA	2745,717	15			
	% PUFA	1309,919	15			

a R Squared = ,223 (Adjusted R Squared = ,028)

b R Squared = ,332 (Adjusted R Squared = ,165)

c R Squared = ,388 (Adjusted R Squared = ,235)

d R Squared = ,383 (Adjusted R Squared = ,229)

e R Squared = ,221 (Adjusted R Squared = ,027)

f R Squared = ,439 (Adjusted R Squared = ,298)

Annexe 13 : Manova des acides gras pour *Actin*.

GLM

AA EPA DHA saturés MUFA PUFA BY temps

/METHOD = SSTYPE (2)

/INTERCEPT = INCLUDE

/POSTHOC = temps (TUKEY)

/EMMEANS = TABLES (temps) COMPARE ADJ (LSD)

/PRINT = HOMOGENEITY

/PLOT = RESIDUALS

/CRITERIA = ALPHA (.05)

/DESIGN = temps.

**General Linear Model****Between-Subjects Factors**

		N
temps	0	2
	3	2
	5	2
	7	2
	9	2

**Multivariate Tests<sup>c</sup>**

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	1.000	306766.64 <sup>a</sup>	5.000	1.000	.001
	Wilks' Lambda	.000	306766.64 <sup>a</sup>	5.000	1.000	.001
	Hotelling's Trace	1533833.2	306766.64 <sup>a</sup>	5.000	1.000	.001
	Roy's Largest Root	1533833.2	306766.64 <sup>a</sup>	5.000	1.000	.001
temps	Pillai's Trace	2.088	.874	20.000	16.000	.617
	Wilks' Lambda	.000	2.493	20.000	4.266	.184
	Hotelling's Trace	.	.	20.000	.	.
	Roy's Largest Root	708.071	566.457 <sup>b</sup>	5.000	4.000	.000

a. Exact statistic

b. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level

c. Design: Intercept+temps

### Multivariate Tests

	Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Pillai's trace	2.088	.874	20.000	16.000	.617
Wilks' lambda	.000	2.493	20.000	4.266	.194
Hotelling's trace	.	.	20.000	.	.
Roy's largest root	708.071	566.457 <sup>a</sup>	5.000	4.000	.000

Each F tests the multivariate effect of temps. These tests are based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

- a. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

### Univariate Tests

Dependent Variable		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
%AA	Contrast	3.462	4	.865	2.059	.224
	Error	2.102	5	.420		
%EPA	Contrast	20.221	4	5.055	.133	.963
	Error	189.532	5	37.906		
% DHA	Contrast	4.525	4	1.131	.167	.946
	Error	33.837	5	6.767		
% saturés	Contrast	53.953	4	13.488	3.124	.122
	Error	21.590	5	4.318		
% MUFA	Contrast	106.091	4	26.523	.347	.836
	Error	382.192	5	76.438		
% PUFA	Contrast	92.115	4	23.029	.301	.866
	Error	382.226	5	76.445		

The F tests the effect of temps. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Annexe 14 : ANOVA de la composition de *Chgra* en astaxanthine

```

GET DATA /TYPE=XLS
  /FILE='C:\Documents and Settings\DIADIE DIOUF\Mes documents\astaxanthine'+
'.xls'
  /SHEET=name 'Feuill'
  /CELLRANGE=full
  /READNAMES=on
  /ASSUMEDSTRWIDTH=32767.
DATASET NAME DataSet1 WINDOW=FRONT.
UNIANOVA
  mggMS BY traitement temps
  /METHOD = SSTYPE(3)
  /INTERCEPT = INCLUDE
  /POSTHOC = traitement temps ( TUKEY )
  /EMMEANS = TABLES(traitement) COMPARE ADJ(LSD)
  /EMMEANS = TABLES(temps) COMPARE ADJ(LSD)
  /PRINT = DESCRIPTIVE HOMOGENEITY
  /PLOT = RESIDUALS
  /CRITERIA = ALPHA(.05)
  /DESIGN = traitement temps traitement*temps .

```

## Univariate Analysis of Variance

## Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: mg:gMS

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.007 <sup>a</sup>	3	.002	.875	.525
Intercept	.366	1	.366	128.809	.000
traitement	.002	1	.002	.548	.500
temps	5.08E-006	1	5.08E-006	.002	.998
traitement * temps	.006	1	.006	2.075	.223
Error	.011	4	.003		
Total	.385	8			
Corrected Total	.019	7			

a. R Squared = .396 (Adjusted R Squared = -.057)

