



FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Magister en Diversité microbienne

Option : Microbiologie moléculaire

THEME

Recherche et essais de purification de *Spirulina* sp. dans différents habitats et culture d'*Arthrospira* sp. PCC 8005

Présenté par : Melle BOUDOUR Aicha

Devant le jury :

Président :	ABBACI Nafissa	Pr.	Université de Annaba
Directeur :	OUARTSI Akila	M. C.	Université de Annaba
Examineur :	FRIHI Hocine	M. C.	Université de Annaba
Examineur :	BRANES Zidane	M. C.	Université de Annaba
Membre invité :	CHEKIREB Djamel	C. C.	Université de Annaba

Remerciements

Je remercie tout d'abord Dieu qui m'a donné la force et la volonté pour réaliser ce mémoire.

J'adresse mes remerciements les plus chaleureux à Monsieur Djamel CHEKIREB, Directeur de ce mémoire, qui m'a guidé tout au long de ce travail. Je le remercie particulièrement pour ses conseils éclairés dans l'orientation des travaux, ses nombreuses idées, ainsi que pour son soutien moral. Je le remercie de m'avoir fait confiance pour ce travail et d'avoir largement participé à ma formation scientifique.

Je remercie vivement Madame Akila OUARTSI, qui a très généreusement accepté d'apporter son aide et pour que ce travail puisse être achevé et soutenu dans les meilleures conditions. Je la remercie également pour son aide technique au cours de la réalisation de ce travail.

Je remercie vivement Madame le Professeur Nafissa ABBACI d'avoir accepté de présider le jury de ce mémoire.

Ma gratitude va également à Monsieur Hocine FRIHI d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier particulièrement Monsieur Zidane BRANES qui m'a fait l'honneur d'être parmi les membres du jury.

Mes remerciements s'adressent à mes parents, mes sœurs : Kamilia, Assia, Mounia, Lilia, mon frère Badreddine, et ma belle famille.

Mes remerciements s'adressent également à mon mari Mohamed LAFIFI sans qui je n'aurai pas eu l'occasion de réaliser ce travail de mémoire. Merci pour ta présence et ton soutien moral de tous les jours depuis le début de ce travail et jusqu'à aujourd'hui.

Je remercie également les techniciennes, ainsi que tout le personnel du laboratoire de Microbiologie du département de Biochimie : Amel, Nassira, Saâida, et Sakina.

Un merci spécial pour mes collègues et amies de la PG : Diversité Microbienne qui ont contribué par leur soutien et amitié, chacun à sa façon, à la progression de mon travail.

Résumé

Notre étude porte sur la recherche et essais de purification de *Spirulina* sp. dans différents habitats et culture d'*Arthrospira* sp. PCC 8005. Elle comporte deux parties bien distinctes :

1- Première partie : nous avons recherché le genre *Spirulina* dans différents habitats et, par la suite procédé à l'isolement et la purification de ce genre.

La recherche du genre *Spirulina* a été réalisée par des prélèvements des échantillons d'eau et de sol, à partir des eaux douces, des eaux salines et des eaux thermales de Guelma et de Constantine.

La purification du genre *Spirulina* a été réalisée par l'ensemencement selon différentes méthodes d'enrichissement, sur plusieurs milieux sélectifs liquides et solides.

Nous avons remarqué la présence de l'espèce *Spirulina subsalsa* uniquement dans les échantillons d'eau prélevés à partir des sources thermales de la région de Guelma.

Nous avons réussi à étudié les caractères morphologiques de cette espèce, cependant les essais de purification et de culture n'ont pas permis l'obtention des cultures axéniques.

2- Deuxième partie : nous avons réalisé la culture de la souche *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur différents milieux de culture.

La croissance de la souche *Arthrospira* sp. PCC8005 a été étudiée à la fois sur des milieux classiques (BG11, "Spir" et Zarrouk), ainsi que sur des milieux à base d'eaux carbonatées prélevées à partir des sources thermales de la région de Guelma et de Constantine.

Le suivi de la croissance a été fait par la mesure de la densité optique. Par la suite nous avons procédé à l'extraction, le dosage et la caractérisation de divers pigments photosynthétiques (chlorophylle "a", phycocyanine et autres pigments).

Nous avons observé que la croissance de *Arthrospira* sp. PCC8005 sur les différents milieux de culture classiques (BG11, "Spir" et Zarrouk) est pratiquement similaire, avec des concentrations en biomasses finales comparables. Cependant la concentration en biomasse dans le milieu à base d'eau carbonatée de Guelma (pH 9.5), est nettement supérieure à celle obtenue avec l'eau carbonatée de Constantine (pH 9.5).

La concentration de la chlorophylle "a" extraite à partir de différentes biomasses, varie de 0.750 à 1.442 µg/l. Elle est fonction de la quantité en biomasse obtenue dans chaque milieu de culture.

Les concentrations en phycocyanine extraite à partir de différentes biomasses, sont nettement supérieures dans les milieux classiques que celles obtenues avec les milieux à base d'eaux carbonatées des sources thermales de Guelma et de Constantine, avec des taux de pureté allant de 0.5 à 2.11.

La séparation chromatographique des pigments, nous a permis de mettre en évidence la présence de xanthophylle dans les cultures sur milieux (BG11, Zarrouk, "Spir", milieu à base d'eau carbonatée (pH 9.5) de Constantine et milieu à base d'eau carbonatée (pH 9.5) de Guelma).

Mots clés : *Spirulina*, *Arthrospira* sp. PCC 8005, culture, phycocyanine, chlorophylle, pigments.

Abstract

The aim of our study was the research and the purification of genus *Spirulina* sp. from different habitats and culture of *Arthrospira* sp. PCC 8005 strain. It has two distinct parts:

1 - Part one: we have made many researches of the genus *Spirulina* in different habitats, and later proceeded to the isolation and purification of this genus.

The research of genus *Spirulina* was conducted by taking samples of water and soil, from freshwaters, salt waters and thermal waters of Guelma and Constantine.

Purification of the genus *Spirulina* has been achieved by using different methods of enrichment, several selective media liquids and solids.

We noticed the presence of the species *Spirulina subsalsa* only in water samples taken from hot springs of the region of Guelma.

We have successfully studied the morphological characteristics of this species; however purification and culture tests have failed to obtain axenic cultures.

2 - Part two: we realized the culture of *Arthrospira* sp. PCC 8005 on various culture media.

The growth of the strain *Arthrospira* sp. PCC8005 has been studied on both conventional media (BG11, "Spir" and Zarrouk), and on based media from carbonated waters from hot springs of the region of Guelma and Constantine.

The growth was monitored by measuring the optical density. Thereafter we proceeded to extract, dosage and characterization of various photosynthetic pigments (chlorophyll "a" phycocyanin and other pigments).

We observed that the growth of *Arthrospira* sp. PCC8005 on different classics media (BG11, "Spir" and Zarrouk) is almost similar, with comparable concentrations of final biomasses. But the concentration of biomass in the carbonated water (pH 9.5) of Guelma is significantly higher than that obtained with carbonated water (pH 9.5) of Constantine.

The concentration of chlorophyll "a" extracted from different biomasses, ranging from 0.750 to 1.442 μ g/l. It depends on the amount of biomass produced in each culture medium.

Phycocyanin concentrations extracted from different biomasses were significantly higher among the classics media, than those obtained with the waters of hot springs of Guelma and Constantine, with ration purity ranging from 0.5 to 2.11.

The chromatographic separation of pigments has revealed the presence of xanthophyll in culture media (BG11, Zarrouk, and "Spir", carbonated water (pH 9.5) of Constantine and carbonated water (pH 9.5) of Guelma).

Keywords: *Spirulina*, *Arthrospira* sp. PCC 8005, culture, phycocyanin, chlorophyll, pigments.

ملخص:

تهدف دراستنا إلى البحث و تنقية الجنس *Spirulina* في مناطق مختلفة وكذلك دراسة نمو الصنف *Arthrospira* sp. PCC 8005 و تتضمن دراستنا جزئاً مختلفين :

1- الجزء الأول: يتضمن القيام بالبحث عن الجنس *Spirulina* في أوساط مختلفة، بالإضافة إلى تنقية هذا الجنس.

عملية البحث أجريت عن طريق أخذ عينات من المياه و التربة من المياه العذبة، المياه المالحة و المياه الساخنة لمنطقتي قالمة و قسنطينة.

تنقية الجنس *Spirulina* تم إجرائها بإستعمال عدة طرق و عدة أوساط زراعية خاصة سائلة و صلبة. لقد لاحظنا وجود الصنف *Spirulina subsalsa* فقط في العينات المأخوذة من المياه الساخنة لمنطقة قالمة. لقد نجحنا في دراسة الخصائص المورفولوجية لهذا الصنف ، و لكن مختلف الطرق المستعملة لتنقيته لم تعطى نتائج إيجابية.

2- الجزء الثاني : يتضمن القيام بدراسة نمو الصنف *Arthrospira* sp. PCC 8005 في الأوساط الزراعية :

(BG11, "Spir", Zarrouk) و كذلك في أوساط متكونة من المياه الساخنة المأخوذة من منطقتي قالمة و قسنطينة، كما تم استخلاص الصابغات: Chlorophylle "a", phycocyanine.

لقد لاحظنا أن نمو *Arthrospira* sp. PCC 8005 في كل من الأوساط (BG11, Spir, Zarrouk) متمائل، أما بالنسبة للأوساط المتكونة من المياه الساخنة فهو يمتلف.

تركيز الصبغة " Chlorophylle "a" يتراوح بين 0.750 و 1.442µg، و هو مرتبط بكمية الكتلة الحيوية المنتجة في كل وسط.

تركيز الصبغة phycocyanine في الأوساط التالية: BG11, "Spir", Zarrouk أكثر بكثير مقارنة مع تلك التي تم الحصول عليها في الأوساط المتكونة من المياه الساخنة لكل من قالمة و قسنطينة.

الفصل الكروماتوغرافي كشف عن وجود الصبغة Xanthophylle في الأوساط: "Spir" BG11 ، مياه كاربوناتية (pH 9.5) من قالمة ومياه كاربوناتية (pH 9.5) من قسنطينة.

الكلمات الرئيسية : *Spirulina* , *Arthrospira* sp. PCC 8005, زرع, كلوروفيل ا, فيكوسيانين, صابغات.

Liste des Figures

Figures	Titres	Pages
1	morphologie de différents types cellulaires des cyanobactéries filamenteuses	03
2	cycle de vie de <i>Arthrospira</i> sp.	11
3	morphologie de <i>Spirulina subsalsa</i>	72
4	morphologie de <i>Arthrospira</i> sp. PCC 8005	81
5	concentrations en chlorophylle "a " selon le milieu de culture utilisé	94
6	séparation chromatographique des pigments photosynthétiques de <i>Arthrospira</i> sp. PCC 8005	98

Listes des Photos

Photos	Titres	Pages
1	culture de <i>Microcystis</i> sp. sur milieu BG11 (Lac Tonga)	65
2	culture de <i>Microcystis</i> sp. sur milieu BG11 (Lac Noir)	65
3	<i>Lyngbya</i> sp. (Sebkha de Ain M'lila)	65
4	<i>Lyngbya</i> sp. (Sebkha de Ain M'lila)	69
5	culture de <i>Lyngbya</i> sp. sur milieu BG11 (pH 7)	69
6	culture de <i>Lyngbya</i> sp. sur milieu BG11 (pH 10)	69
7	culture de <i>Arthrospira</i> sp. PCC 8005 sur le milieu BG11 (pH 9.5)	82
8	culture de <i>Arthrospira</i> sp. PCC 8005 sur le milieu "Spir"	83
9	culture de <i>Arthrospira</i> sp. PCC 8005 sur le milieu Zarrouk (pH 9.5)	85
10	culture de <i>Arthrospira</i> sp. PCC8005 sur milieu à base d'eau carbonatée de sources thermales de Guelma	86
11	culture de <i>Arthrospira</i> sp. PCC 8005 sur le milieu à base d'eau carbonatée de sources thermales de Constantine	89
12	extraits de phycocyanine selon le milieu de culture utilisé	95
13	visualisation des extraits de phycocyanine sous lumière ultra-violette	96

Sommaire

Première partie : Etude bibliographique

Introduction

Chapitre I : Les cyanobactéries filamenteuses

1. Introduction	01
2. Morphologique des cyanobactéries filamenteuses	01
3. Biotope	04
4. Classification bactériologique et botanique	04

Chapitre II : Les Oscillatoriales

1. Définition	06
2. Clé d'identification des genres	06
3. Les genres <i>Arthrospira</i> , <i>Spirulina</i> et <i>Lyngbya</i>	07
3. 1. Ecologie et habitats	07
3. 2. Caractéristiques et aspects phénotypiques	08
4. Le genre <i>Arthrospira</i>	09
4. 1. Historique	09
4. 2. <i>Arthrospira platensis</i>	09
4. 3. Cycle de vie	10
4. 4. Mobilité	11
5. Le genre <i>Spirulina</i>	13
5. 1. <i>Spirulina subsalsa</i>	13
5. 2. <i>Spirulina platensis</i>	13
5. 3. Autres espèces	14
6. Le genre <i>Lyngbya</i>	16
6. 1. Toxicité	16
6. 2. Différentes espèces	16
7. Phylogénie moléculaire (<i>Arthrospira</i> et <i>Spirulina</i>)	18
8. Composition biochimique de <i>Arthrospira</i>	19
8. 1. Protéines	19
8. 2. Lipides	19
8. 3. Glucides	19
8. 4. Acides nucléiques	20
8. 5. Vitamines	20
8. 6. Minéraux et oligo-éléments	21
8. 7. Pigments	22

Chapitre III : Intérêts alimentaire, thérapeutique et biotechnologique du genre *Arthrospira*

1. Aspect alimentaires	23
2. Aspects thérapeutiques	23
3. Aspects toxicologiques	24

4. Aspects biotechnologiques	24
• Paramètres de culture	24
▪ Le milieu de culture	25
▪ Lumière et agitation	26
• Systèmes de culture	26
▪ Les photobioréacteurs	26
▪ Les fermes industrielles	27

Deuxième partie : Matériels et méthodes

1. Matériels	28
1. 1. Appareillages	28
1. 2. Verrerie et autres matériels	
2. Méthodes	29
2. 1. Recherche du genre <i>Spirulina</i> dans différents biotopes	29
2.1.1. Présentation des milieux d'études et échantillonnage	29
2. 1. 1. 1. Eaux douces	29
• Lac Noir	29
• Lac Tonga	29
• Lac Bleu	30
2. 1. 1. 2. Eaux salines	33
• Sebkha de Ain M'lila	30
• Lac El-Mellah	30
2. 1. 1. 3. Eaux thermales	31
• Sources thermales de la région de Guelma	31
• Sources thermales de la région de Constantine	31
2. 1. 2. Observations microscopiques des échantillons	31
2. 1. 3. Ensemencement	32
2.1.3.1. Echantillons des eaux douces	32
2.1.3.2. Echantillons des eaux salines	37
2.1.3.3. Echantillons des eaux thermales	43
3. Culture de <i>Arthrospira</i> sp. PCC 8005	55
3. 1. Protocole expérimental	55
3. 1. 1. But de la culture	55
3. 1. 2. Milieux de cultures testés	55
3. 1. 3. Examen microscopique	55
3. 1. 4. Préparation de l'inoculum	56
3. 1. 5. Ensemencement	58
3. 1. 6. Suivi de la croissance	60
3. 1. 7. Dosage de la chlorophylle "a"	60
3. 1. 8. Mise en évidence de la production de phycocyanine	60
3. 1. 9. Mise en évidence de la production d'autres pigments	61

Troisième partie : Résultats et discussion

1. Recherche du genre <i>Spirulina</i> dans différents biotopes	63
1. 1. Examen des échantillons des eaux douces	63
1. 1. 1. Observations microscopiques	63
1. 1. 2. Enrichissement sur le milieu BG11	64

1. 1. 3. Conclusion	66
1. 2. Examen des échantillons des eaux salines	66
1. 2. 1. Observations microscopiques	66
1. 2. 2. Enrichissement sur le milieu BG11	67
1. 2. 3. Conclusion	71
1. 3. Examen des échantillons des thermes	71
1. 3. 1. Observations microscopiques	71
1. 3. 2. Enrichissement	73
1. 3. 2. 1. Echantillons des sources chaudes de la région de Guelma	73
1. 3. 2. 2. Echantillons des sources chaudes de la région de Constantine	79
1. 3. 3. Conclusion	79
2. Culture de <i>Arthrospira platensis</i> PCC8005	80
2. 1. Objectifs du travail	80
2. 2. Examen microscopique	80
2. 3. Etude de la croissance de <i>Arthrospira</i> sp. PCC 8005 sur les milieux de culture classiques	81
2. 3. 1. Croissance de <i>Arthrospira</i> sp. PCC 8005 sur le milieu BG11	81
2. 3. 2. Croissance de <i>Arthrospira</i> sp. PCC 8005 sur le milieu "Spir "	83
2. 3. 3. Croissance de <i>Arthrospira</i> sp. PCC 8005 sur le milieu Zarrouk	84
2. 3. 4. Discussion	86
2. 4. Etude de la croissance de <i>Arthrospira</i> sp. PCC 8005 sur eaux carbonatées de sources thermes	86
2. 4. 1. Croissance de <i>Arthrospira</i> sp. PCC 8005 sur milieu à base d'eau thermale de Guelma	86
2. 4. 2. Croissance de <i>Arthrospira</i> sp. PCC 8005 sur milieu à base d'eau thermale de Constantine	89
2. 5. Etude comparative entre les biomasses obtenues dans les sept milieux de culture	92
2. 6. Conclusion	92
3. Composition de <i>Arthrospira</i> sp. PCC 8005 en divers pigments	93
3. 1. La chlorophylle "a"	93
• Discussion	94
3. 2. La phycocyanine	94
• Discussion	96
3. 3. Mise en évidence et caractérisation d'autres pigments	97
• Discussion	99
4. 4. Conclusion	99

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

Etude bibliographique

Introduction :

Arthrospira est une cyanobactérie qui se caractérise par la production d'une grande variété de substances intéressantes et principalement des protéines d'une très haute valeur nutritive. Elle est riche en protéines (70%) et rentre dans l'alimentation de certaines populations d'Afrique, au Tchad et au Niger, sous forme de galettes séchées (Palmont, 1992). Sa récolte et son utilisation alimentaire ont aussi été signalées dans plusieurs pays à travers le monde (Kenya, Zambie, Ethiopie, Inde, Thaïlande, Mexique et Pérou) (Iltis, 1970).

Arthrospira recèle aussi d'autres substances plus complexes et dont le rôle thérapeutique, à la fois curatif et préventif, n'a été démontré que depuis le début des années 90. Il s'agit essentiellement de la phycocyanine et de certains polysaccharides (Doke, 2005).

Le genre *Arthrospira* se développe naturellement dans les eaux alcalines de certains lacs en zones chaudes. Ces eaux sont généralement riches en carbonate de sodium (Na_2CO_3) ou en bicarbonate de sodium (NaHCO_3) ce qui leur confère des valeurs de pH comprises entre 9 et 10 (Fox, 1999).

Arthrospira se présente généralement sous forme de trichome bleu-vert, mobile, enroulé régulièrement en spires larges et très ouvertes (Palmont, 1995). La principale source d'énergie d' *Arthrospira*, est la lumière solaire, et l'élément de base du milieu de culture est le natron. Les régions à climat désertique (Sahara algérien) sont riches en natron et sont donc bien placées pour cultiver à grande échelle *Arthrospira*.

A Tamanrasset (sud algérien), des mini-fermes comprenant trois bassins agités ont été installées en vue de la culture de *Spirulina* (*Arthrospira*) et depuis, de petites unités de productions sont envisagées pour développer la culture de cette cyanobactérie à Tamanrasset même et de là, l'étendre à toute l'Algérie (Salès, 2004).

D'autres essais de culture de *Arthrospira*, ont été réalisés dans d'autres régions d'Algérie et particulièrement au lac d'El Goléa. Les premiers résultats sont encourageants et montrent que la souche utilisée s'est bien adaptée et qu'elle a formée une pellicule verdâtre à la surface de l'eau et ce après un mois de culture (Brahimi *et al.*, 2000).

Objectifs du travail :

Nos deux principaux objectifs sont l'isolement de souches de *Spirulina* d'une part et la culture d'*Arthrospira* sp. PCC 8005 d'autre part. Pour ce faire, nous avons respecté les étapes suivantes :

1. La recherche du genre *Spirulina* dans différents habitats :

- Prélèvement d'échantillons d'eau de surface et de sol (eaux douces, eaux salines et eaux thermales).
- Ensemencement sur plusieurs milieux de culture sélectifs (liquides et solides).
- Utilisation de milieux de culture spécifiques et sélectifs (en rajoutant des antibiotiques) dans le but de sélectionner le genre *Spirulina*.

2. La culture de la souche *Arthrospira* sp. PCC 8005 :

- Etude de la croissance d'*Arthrospira* sp. PCC 8005 sur des milieux classiques
- Etude de la croissance d'*Arthrospira* sp. PCC 8005 sur des milieux à base d'eaux carbonatées provenant des sources thermales de Guelma et de Constantine.
- Mise en évidence de la production de phycocyanine.
- Dosage de la chlorophylle " a ".
- Caractérisation par chromatographie des autres pigments photosynthétiques.

CHAPITRE I

Les cyanobactéries filamenteuses

1. Introduction :

Les cyanobactéries sont des procaryotes photosynthétiques capables de synthétiser la chlorophylle en utilisant le H₂O comme donneur d'électron qui mène à la production d'oxygène. Ce sont également les seuls procaryotes à réaliser la photosynthèse oxygénique, similairement aux algues et les plantes supérieures (Mary, 2003).

Leur longue histoire évolutive est considérée comme une des raisons pour le succès des cyanobactéries dans beaucoup d'habitats même les plus extrêmes et dans leur grande tolérance écologique (Ballot, 2004).

Les cyanobactéries présentent une très grande diversité morphologique, elles peuvent être unicellulaires ou filamenteuses, regroupées en colonies, ou sous forme isolée.

Une prolifération importante de certaines cyanobactéries filamenteuses est généralement accompagnée d'écumes facilement observables en période d'apparition de fleurs d'eau ou blooms.

Les principaux genres des cyanobactéries filamenteuses responsables de l'apparition des fleurs d'eaux sous les conditions favorables sont : *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Aphanizomenon*, *Arthrospira*, *Oscillatoria*, *Nodularia*, *Nostoc* et *Planktothrix* et dont certaines espèces peuvent synthétiser des cyanotoxines responsables de plusieurs intoxications animale et humaine (Debois, 2007).

Peu d'études ont été réalisées sur les cyanobactéries filamenteuses, autres que *Arthrospira*, en vue de l'utilisation alimentaire pour l'homme, sans doute par manque de traditions culinaires et en raison de difficultés techniques.

Microcoleus chthonoplastes joue un rôle fondamental dans l'exploitation des marais salants en constituant une couche multistratifiée et épaisse de plusieurs millimètres recouvrant le fond des bassins et permettant la récolte du sel sans mélange avec la vase; la culture de *Rivularia mesenterica* pourrait aussi être intéressante à tenter dans la mesure où, dans la nature, son développement est très rapide; de même *Lyngbya majuscula*, qui forme des touffes atteignant plusieurs centimètres, devrait aussi constituer un bon matériel pour l'aquaculture (Site web1).

2. Morphologie des cyanobactéries filamenteuses :

En fonction de leur complexité, les cyanobactéries filamenteuses présentent plusieurs types cellulaires (figure 1) :

➤ **Les cellules végétatives** sont des formes variées (rondes, ovoïdes, oblongues, quadratiques) et avec un contenu cellulaire homogène ou non, avec ou sans vacuoles à gaz. elles sont responsables de l'activité photosynthétique et de la nutrition carbonée de l'organisme.

➤ **Les hétérocystes** sont des cellules à parois épaisses, habituellement translucides, qui se rencontrent chez certaines cyanobactéries filamenteuses (dites hétérocystées). Ils sont le site de la fixation d'azote et se forment à partir des cellules végétatives en conditions limitantes d'azote.

L'hétérocyste est caractérisé par la présence de nodules polaires aux points d'attache aux cellules végétatives et suivant les espèces on rencontre des hétérocystes intercalaires et/ou terminaux. Les hétérocystes peuvent être circulaires, ovales, triangulaires, carrés ou rectangulaires.

➤ **Les akinètes** sont des spores immobiles produites chez les formes filamenteuses hétérocystées. Elles sont résistantes aux conditions défavorables et demeurent viables sur de longues périodes. On les distingue par leur grande taille, leur forme, leur pigmentation modifiée et la présence de nombreux granules cytoplasmiques.

Les akinètes peuvent se former n'importe où sur le filament. On observe cependant souvent une localisation préférentielle au voisinage des hétérocystes.





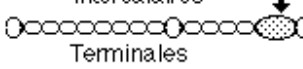

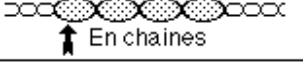
➤ **Les ramifications** on distingue deux grands types de ramifications chez les cyanobactéries filamenteuses ; les fausses ramifications et les vraies ramifications.





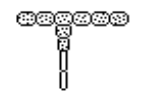
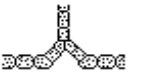
➤ **Les hormogonies** sont des formes de multiplication asexuée chez certaines cyanobactéries filamenteuses. Ce sont de groupes de cellules qui s'échappent à l'extrémité de la gaine de certaines formes de cyanobactéries filamenteuses ou qui résultent de la germination d'akinètes et peuvent être mobiles ou immobiles.

➤ **Les gaines** qui peuvent être minces, épaisses, lamellaires ou diffuses.

➤ **Autres structures :**

- **Le calyptra** est une formation épaissie à l'extrémité de certaines formes filamenteuses
- **Le necridium** est une structure formée à partir d'une cellule morte qui constitue un point de fracture du filament (Site web 2).

Cellules végétatives	Hétérocystes	Spores ou Akinètes
Activité photosynthétique	Fixation de l'azote	Conservation Dissémination
	 Intercalaire bipolaire  Terminal unipolaire	 Intercalaires  Terminales  En paires  En chaînes

Fausse en Y		 Les fausses ramifications résultent d'une extrusion mécanique du filament à travers la gaine qui croît moins vite que le filament 
Fausse géminée		
Vraie en T		Les ramifications vraies résultent de divisions cellulaires à angle droit par rapport au filament principal. Elles peuvent impliquer une seule cellule (T) ou deux cellules (Y renversé)
Vraie en Y renversé		

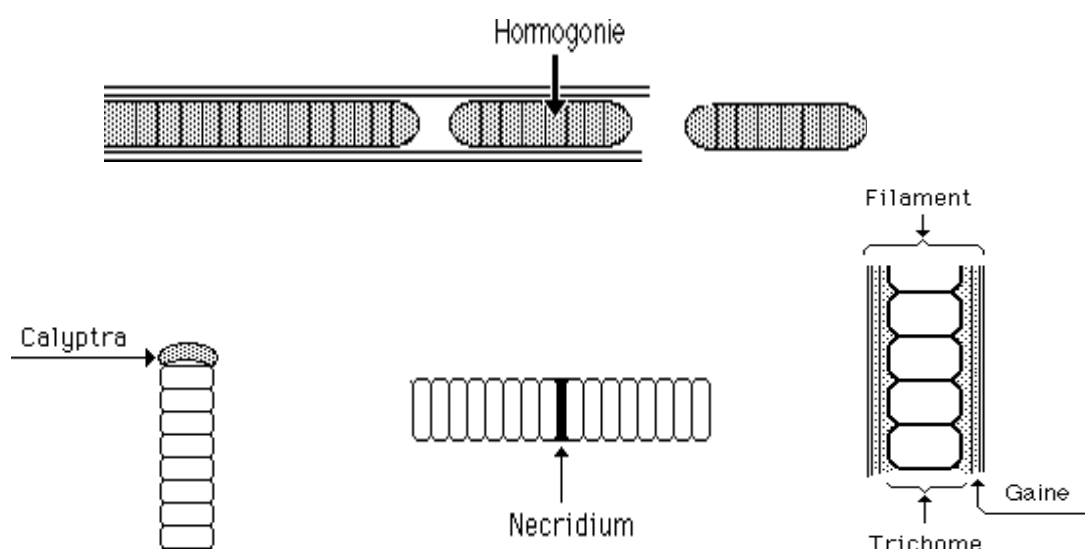


Figure 1 : morphologie de différents types cellulaires des cyanobactéries filamenteuses (Site web 2).

3. Biotope :

Les cyanobactéries filamenteuses sont répertoriées dans la plupart des habitats; elles sont présentes dans tous les pays du monde et en tous lieux, aussi bien dans les milieux aquatiques que dans les milieux désertiques (Silvano, 2005).

Les eaux douces sont dominées par les cyanobactéries filamenteuses possédant des vésicules de gaz (*Anabaena flos-aquae*, *Anabaenopsis*, *Lyngbya*, et *Anabaena discoidea*).

Les lacs alcalins des zones tropicales et subtropicales sont dominés par une communauté unique des cyanobactérie caractérisée par un développement massif et la formation des blooms de cyanobactéries filamenteuses ; représentés principalement par les espèces suivantes: *Arthrospira fusiformis*, *Anabaenopsis abijatae*, *Anabaenopsis arnoldii* et *Anabaena* sp.

Les sources chaudes de plusieurs environnements mondiales sont colonisées par les cyanobactéries filamenteuses thermophiles appartenant aux genres : *Calothrix*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Pseudanabaena*, *Synechococcus*, *Synechocystis* et *Spirulina*.

Les membres de deux genres *Phormidium* et *Synechococcus* sont communément fréquents dans ces habitats thermiques (Ballot, 2004).

4. Classifications bactériologique et botanique

Les cyanobactéries sont reconnues à la fois par le Code International de Nomenclature Botanique et par le Code International de Nomenclature Bactériologique.

Le premier se base essentiellement sur le mode de reproduction et la morphologie tandis que le second est fondé sur des critères physiologiques et génotypiques de cultures pures.

Ces deux classifications reconnaissent cependant les mêmes sections ou ordres (tableau 1) et les divergences résident essentiellement au niveau des taxons inférieurs (espèces).

Il existe ainsi cinq ordres divisés en vingt sept familles qui comportent cent soixante six genres de cyanobactéries (Thomazeau, 2006).

Tableau 1 : correspondance des deux systèmes de classification des cyanobactéries

Description	Classification botanique	Classification bactériologique
Formes unicellulaires ou coloniales, à multiplication par fission binaire et/ou formation d'exospores	Chroococcales	section I
Formes coloniales à multiplication par fissions multiples formant des baeocytes.	Pleurocapsales	section II

Tableau 1 (suite):

Description	Classification botanique	Classification bactériologique
Formes filamenteuses unisériées, non hétérocytées, sans ramification, à division cellulaire perpendiculaire à l'axe du trichome.	Oscillatoriales	section III
Formes filamenteuses à différenciation cellulaire (hétérocytes et akinètes), à division cellulaire dans un seul plan	Nostocales	section IV
Formes filamenteuses à différenciation cellulaire (hétérocytes et akinètes), présentant des ramifications (vraies ou fausses), à division cellulaire dans plusieurs plans	Stigonematales	section V

CHAPITRE II
Les Oscillatoriales

1. Définition :

L'ordre des Oscillatoriales regroupe les cyanobactéries filamenteuses qui présentent différentes caractéristiques : division par fission binaire dans un seul plan, avec production de cellules végétatives (formes filamenteuses homocystées), absence des hétérocystes ou akinètes, présence de gaine ou de fausses ramifications chez certains genres, chez d'autres le trichome peut être enroulé en spires fermées ou ouvertes, certaines formes de cyanobactéries se reproduisent végétativement par la formation d'hormogonies (groupe de cellules mobiles libérées du trichome), grandes tailles du génome ($2.14-5.19 \times 10^9$ daltons).

Les membres du sous-groupe 3 sont fréquents dans des habitats très divers ; ils sont présents aussi bien dans les milieux aquatiques (des eaux douces aux eaux marines) que dans les milieux terrestres formant des croûtes et des touffes.

Les blooms des sources chaudes de certaines cyanobactéries de ce sous-groupe se développent à des températures d'environ 62 °C, les relations de symbiose sont rares (Castenholz, 2001).

2. Clé d'identification des genres :

L'ensemble des genres appartenant aux sous-groupe 3 est subdivisé et présenté comme suit :

I- Trichomes non cylindriques (aplatis ou avec section à trois branches)

A- Trichomes aplatis (section ellipsoïdale) : genre *Crinalium*

B- Trichomes avec section à trois branches : genre *Starria*

II- Trichomes cylindriques

A- Trichomes enroulés en hélice ouverte ou fermé

1-Trichome en hélice presque fermé, parois cellulaires fines et invisibles sous microscope optique : genre *Spirulina*

2-Trichome en hélice ouverte, parois cellulaires visibles sous microscope optique : genre *Arthrospira*

B -Trichomes droits ou légèrement sinueux sur une partie du trichome

1-Trichomes souvent engainés, immobiles (certains produisent des hormogonies)

➤ Deux ou plusieurs trichomes par une seule gaine : genre *Microcoleus*

➤ Un seul trichome par gaine, les hormogonies sont mobiles : genre *Lyngbya* (incluant *Porphyrosiphon*, *Phormidium*).

2-Trichomes souvent mobiles, pas de gaine persistante

➤ Absence (1/8 de diamètre du trichome) de constriction intercellulaires ou très faible : genre *Oscillatoria* et *Trichodesmium*.

➤ Présence des constriction intercellulaires, présentant 1/8 de diamètre du trichome genre *Pseudeanabaena* (Castenholz, 2001)

3. Les genres *Arthrospira*, *Spirulina* et *Lyngbya* :

3. 1. Ecologie et habitat :

Le genre *Arthrospira* se trouve naturellement dans les eaux marines, les lacs alcalins, contenant du carbonate de sodium (Na_2CO_3), ou du bicarbonate de sodium (NaHCO_3) (Fox, 1999). Certaines formes sont planctoniques par la présence de vésicules de gaz, d'autres sont benthiques sans vésicules de gaz (Castenholz, 2001).

Les lacs alcalins-salins des zones tropicales et subtropicales sont connus par la formation des blooms caractérisés par une population massive unicyanobactériale d' *Arthrospira fusiformis* (Syn. : *Spirulina fusiformis*) (Ballot, 2004).

Le genre *Lyngbya* est fréquent dans les eaux douces à cours lent, sur les vases du fond des rivières tranquilles et sur les parties immergées des plantes aquatiques, sur les roches humides ou l'eau suinte. Ce genre *Lyngbya* contribue aussi à donner à certaines vases d'eaux stagnantes leur odeur particulière, il communique aussi le "goût de vase" aux poissons d'eaux douces ou d'eaux quelque peu saumâtres. Certaines espèces supportent bien les variations de salinité comme par exemple : *Lyngbya astuartii* car elle vit indifféremment en eau douce, salée ou saumâtre (Ozanda, 2000). Notons enfin qu'il existe des espèces qui habitent les eaux chaudes et d'autres les eaux très froides (Feldmann *et al.*, 1978).

Le genre *Spirulina* se trouve fréquemment dans les eaux douces, eaux marines, eaux hyper-salées (Castenholz, 2001), ou dans certaines sources d'eaux chaudes à des températures supérieures à 50 °C (Ballot, 2004). Il est abondant aussi dans les eaux natronées (Iltis, 1970), mais il peut être aussi terrestre pendant les périodes de sécheresses (Castenholz, 2001).

Sous des conditions favorables le genre *Spirulina* peut former des populations benthiques très denses (Ulrich *et al.*, 2000).

3. 2.

Caractéristiques et aspects phénotypiques :

Le genre *Arthrospira* regroupe les microorganismes filamenteuses à trichomes bleu-vert, mobiles, enroulés régulièrement en spires larges et très ouvertes, parois intercellulaires facilement visible sous microscope optique, absence d'hétérocyste, pourvus de vésicules de gaz pour atteindre la lumière pour la photosynthèse, phototrophes obligatoires, parfois les spires au centre du trichome sont plus rapprochées qu'aux extrémités, avec un diamètre de spire plus petit au centre et aux extrémités (planche 1). Les spires peuvent être espacées régulièrement avec un diamètre constant ou bien relaxées de sorte à former un filament presque droit, il peut y avoir peu de spires (une à trois), ou beaucoup (plus de cent), le diamètre des cellules varie de 3.5 à 11 μ , le diamètre des spires de 20 à 100 μ (Fox, 1999).

La forme hélicoïdale du trichome, observable uniquement en milieu liquide est caractéristique du genre *Arthrospira*, mais les paramètres de l'hélice (épaisseur, longueur) varient selon les espèces (Richmond, 1986).

Le genre *Spirulina* regroupe les cyanobactéries filamenteuses présentant les caractères suivants : trichome en hélice presque fermée, paroi intercellulaire fine et invisible sous microscope optique, absence de gaine visible, absence d'hétérosyste, diamètre de trichome de 1 à 5 µm (planche 2), mobilité permanente par rotation, multiplication par simple fission binaire, couleur variable ; de bleu-vert à rouge chez certaines espèces marines à cause de la présence de la phycoérythrine comme principal pigment, taille du génome (2.53×10^9 daltons) (Castenholz, 2001).

Le genre *Lyngbya* regroupe les cyanobactéries filamenteuses, entourées d'une gaine persistante, le diamètre du trichome varie de 1 µm à 80 µm, les cellules sont nettement plus courtes que larges (planche 3), la taille de génome dans une souche de référence est de 4.58×10^9 , la multiplication se fait par fission binaire dans un seul plan, absence de vésicules de gaz, la mobilité concerne essentiellement les fragments courts du trichome sans gaine libérés du trichome et appelés hormogonies. Ces hormogonies peuvent être confondues avec le genre *Oscillatoria* jusqu'à production d'une nouvelle gaine d'où la nécessité d'une longue période de culture; en général les espèces avec des gaines épaisses sont difficiles à isoler et, sur agar la production des hormogonies mobiles n'est pas assurée. Enfin il est à noter que ; comme le genre *Lyngbya* a été peu étudié en culture; sa physiologie est moins connue (Castenholz, 2001).

4. Le genre *Arthrospira* :

4. 1. Historique :

Arthrospira, bien que déjà décrite par Wittrock et Nordstedt en 1844, ne fut vraiment redécouverte qu'en 1940 au Tchad par un botaniste français du nom de Dangeard. Les Kanembous, tribu du Tchad, la consomment encore de nos jours sous le nom de Dihé. Depuis, on a su par les archives mexicaines que *Arthrospira* était aussi consommée du temps des Aztèques (Farrar, 1966), bien avant l'arrivée des Espagnols, sous le nom de Tecuitlatl. Depuis la mise en place de la culture en masse des microalgues à la fin des années 50, elle connaît un regain de popularité pour l'alimentation humaine.

Cependant, cette cyanobactérie resta une simple curiosité avant le 7^{ème} congrès du pétrole en 1967 à Mexico, à l'occasion duquel des chercheurs de l'Institut Français du pétrole rendirent compte de leurs travaux sur *Arthrospira* qui jusque là sont restés confidentiels.

Ce fut l'origine de sa première exploitation industrielle, en 1976, par la société Sosa Texcoco basée au Mexique. Depuis, plusieurs entreprises se sont implantées un peu partout : Siam Algae Company à Bangkok en 1979, Earthrise farm aux Etats-Unis en 1983 (le plus gros producteur actuel), Cyanotech Corporation à Hawaï, etc. En 1995, il existe une vingtaine d'exploitations industrielles dans le monde (Fox, 1999), et actuellement, leur nombre avoisine la trentaine

La première culture artisanale de *Arthrospira* méritant vraiment cette appellation revient sans doute à Fox Ripley qui fut le premier à lancer cette activité en Inde en 1973, en collaboration avec le Navsari Agricultural College .

Depuis, maints progrès ont été faits pour permettre et améliorer son exploitation dans toutes les régions du monde, à petite échelle (Fox, 1999).

4. 2. *Arthrospira platensis* :

L'existence au Tchad de la Cyanophycée *Arthrospira platensis*, utilisée dans l'alimentation humaine, a été mentionnée pour la première fois par Dangeard dans les extraits des procès verbaux de séances de la Société Linnéenne de Bordeaux en 1940 (Iltis, 1970). Il s'agissait d'échantillons séchés sans indication de lieu exact de récolte. Cette algue bleue a été ensuite trouvée en grande quantité dans les petits lacs et mares temporaires du Kanem (Tchad) ; Compère (1967) a aussi déterminée la présence de cette espèce dans les lacs Katam, Djobo et Yoan où elle forme des peuplements très denses.

Signalons que des souches d'*Arthrospira platensis* (déterminées par erreur sous le nom de *Spirulina maxima* (Geitler) ont été récoltées dans le lac de Rombou, près de Mao (Kanem) pour l'Institut Français du Pétrole et ont fait, l'objet de culture en milieu artificiel et d'essais de production industrielle (Zarrouk, 1966).

Dans le reste de l'Afrique, cette Cyanophycée a été observée au Kenya, en basse Égypte, au Congo-Kinshasa, en Zambie et en Ethiopie

En dehors de l'Afrique, *Arthrospira platensis* a été observé aussi en Israël dans le lac de Tibériade où il atteint de fortes densités de peuplement, ainsi que dans des étangs de pisciculture de la vallée du Jourdain (Iltis, 1970).

• Origine de la souche *Arthrospira* sp. PCC 8005 :

L'origine précise de *Arthrospira* sp. PCC 8005 n'est pas connue. Cette souche appartient à un groupe de 4 souches isolées d'Inde, du Kenya, du Mexique et du Pérou puis déposées auprès de la Collection de Cyanobactérie de l'Institut Pasteur (PCC) par le Dr. Jeeji-Bai en 1980. Malheureusement, le cahier contenant les informations relatives à ces souches a été perdu (Rippka, communication personnelle). Néanmoins, la séquence ITS de la souche PCC8005 est identique à celle d'une autre souche indienne (*A. indica*) qui fut donnée plus tard par le Dr. Jeeji-Bai à Scheldeman (Scheldeman et al., 1999).

La confusion entre les deux noms *Arthrospira* et *Spirulina* est due à la décision d'unifier les deux genres *Arthrospira Stizenberger* et *Spirulina Turpin* sur la base de leurs trichomes en spirale (Geitler, 1932). Néanmoins la "vraie" *Spirulina* n'est pas affiliée au genre *Arthrospira* (Nelissen et al., 1994).

4. 3. Cycle de vie :

Le cycle de reproduction de *Arthrospira* en culture au laboratoire est plutôt simple ; un trichome mûr est divisé en plusieurs morceaux à travers la formation de cellules spécialisées appelées nécridies qui subissent elles même une lyse, donnant lieu à une séparation en disques biconcave (figure 2).

La fragmentation du trichome au niveau des nécridies produit plusieurs chaînes de cellules glissantes et courtes (deux à quatre cellules) appelés hormogonie, qui va se déplacer à travers le filament parental et donnant naissance à un nouveau trichome.

Les cellules dans l'hormogonie perdent les portions attachées des cellules nécridiales et deviennent arrondis avec des parois non épaissies. Pendant ce processus, le cytoplasme paraît moins granulé et les cellules d'une couleur bleu-vert pâle. Le nombre de cellules dans l'hormogonie va augmenter par division cellulaire pendant que le cytoplasme devient granulé, et les cellules apparaissent d'une couleur bleu-vert brillante. Par ce processus ces trichomes assument parfaitement la forme hélicoïdale typique du genre et assurent la croissance et la dispersion de l'organisme (Ciferri, 1983).

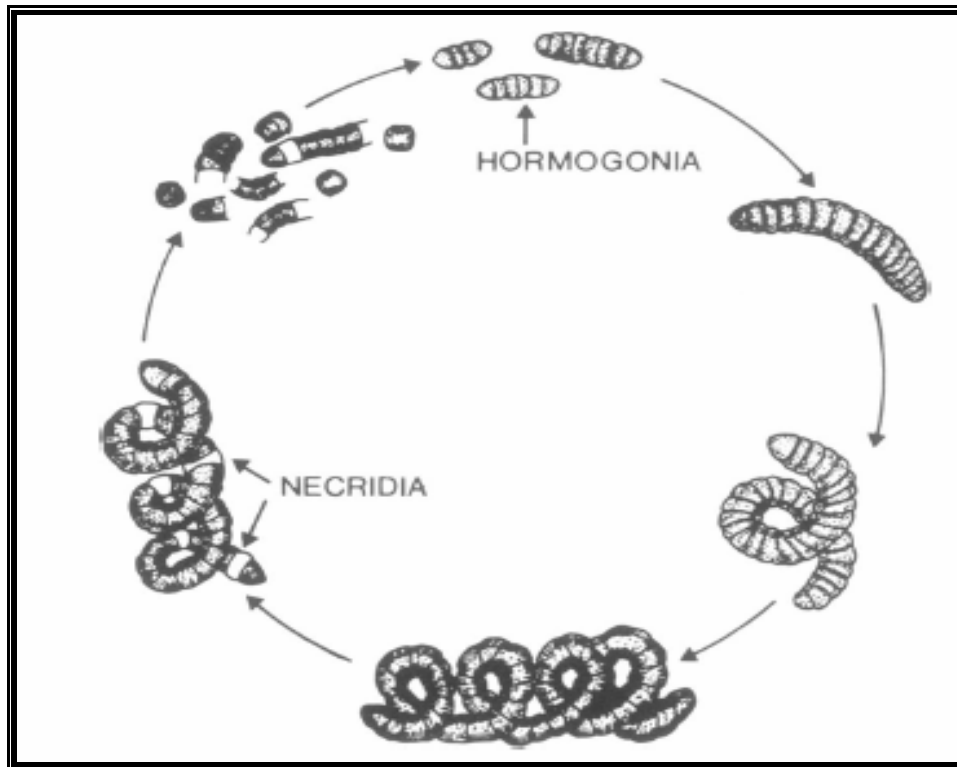


Figure 2 : cycle de vie de *Arthrospira* sp. (Ciferri, 1983)

4. 4. Mobilité :

Les filaments d'*Arthrospira* sont motiles, se déplaçant souvent par des mouvements en vrilles à plus de 5 μ par seconde (Fox, 1999).

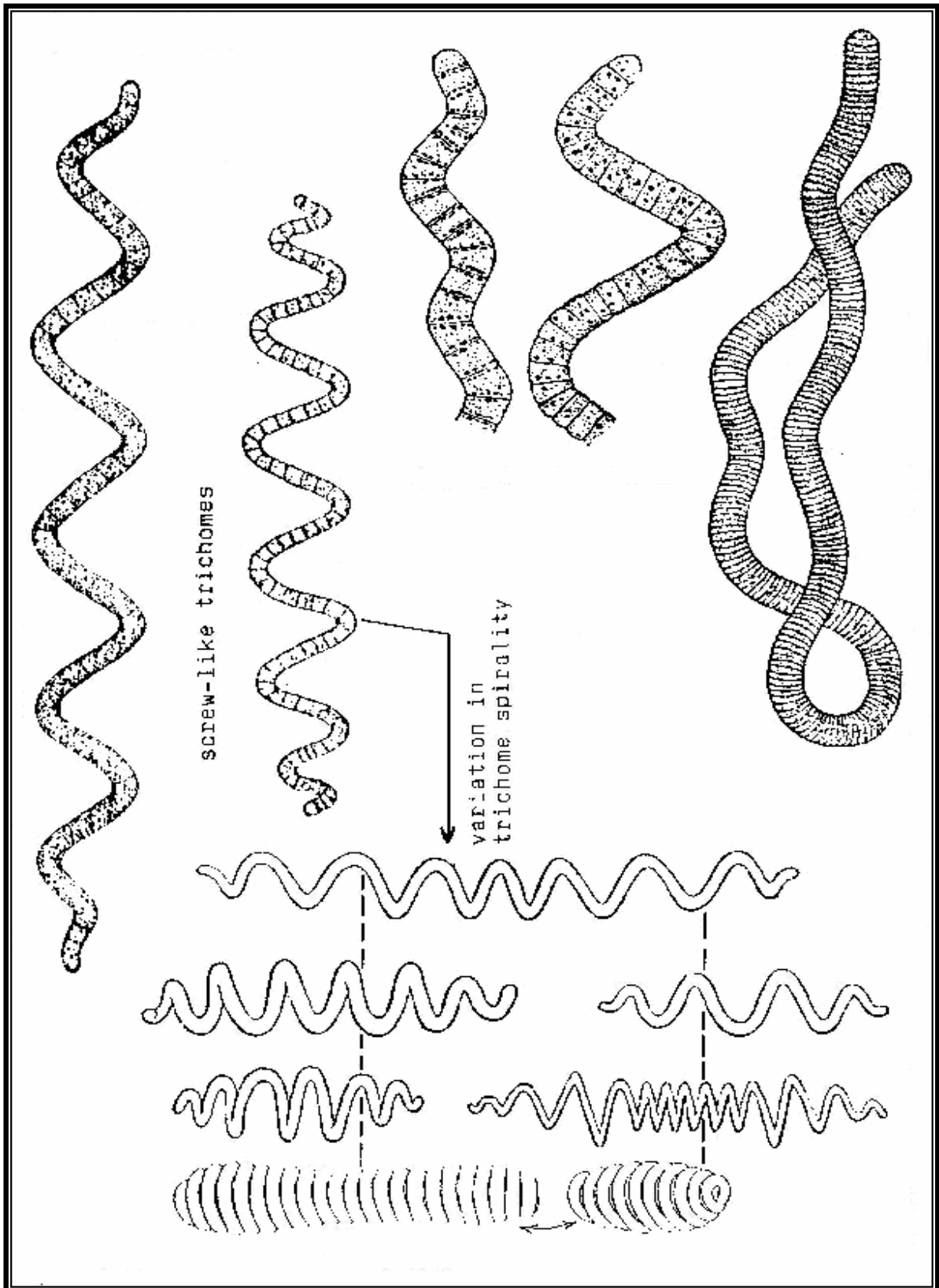


Planche 1 : différentes morphologies de *Arthrospira* sp. (d'après Geitler, 1932).

5. Le genre *Spirulina* :

5. 1. *Spirulina subsalsa* :

Espèce la plus connue, à l'oeil nu, se présente sous forme de masses étalées, érugineuses ou vert jaunâtre, ou de filaments mélangés à diverses autres espèces comme *Lyngbya aestuarii* (Thajuddin *et al.*, 2005). Sa couleur varie beaucoup en fonction de l'intensité de la lumière ; on observe une certaine adaptation chromatique puisque les populations sont souvent bleu-vert clair dans les milieux peu profonds avec forte intensité (sans doute par prédominance de phycocyanine) alors qu'elles prennent une teinte rouge ou brunâtre quand elles se développent plus profondément (quelques mètres) en raison de la prédominance de phycoérythrine (Tomaselli *et al.*, 1995).

Sous microscope, elle se présente sous forme filamenteuse avec trichomes étroitement enroulés spiralés présentant les caractères suivants : non ramifié; sans hétérocyste; sans gaine visible mais sécrétant des polysaccharides formant souvent une masse diffuse; typiquement spiralé, mobile et se vrillant dans le milieu et le degré de spiralisation, très variable, est peut-être en relation avec la salinité: les spires seraient d'autant plus serrées que la salinité est plus élevée (Site web 1), ne montre pas de parois cellulaires transversales visibles au microscope optique; d'un diamètre généralement de 1 à 2 μm ; diamètre des spires de 3-5 μm ; le trichome se multiplie par simple fission binaire. L'axe du filament est sinueux (Castenholz, 2001).

Spirulina subsalsa se classe parmi les espèces de cyanobactéries potentiellement toxiques puisque une toxine à été révélée présente mais non identifiée (Levi *et al.*, 2006).

A ce jour, seule *Spirulina subsalsa* a été analysée et considérée comme un aliment possible pour les humains (Fox, 1999), mais ne semble pas encore être exploitée industriellement tant dans l'alimentation humaine ou animale ou même comme matière première pour en extraire des pigments (phycocyanine en particulier).

• **Distribution** : *Spirulina subsalsa* à une grande distribution écologique ; dans les eaux saumâtres, eau de mer et les sources chaudes (Fox, 1999). Espèce cosmopolite présente en Afrique : Maroc, Algérie, Tunisie, Libye, Tchad, Gabon, Zaïre, Tanzanie, Mozambique, Afrique du Sud, Madagascar (Compère, 1974).

5. 2. *Spirulina platensis* :

C'est l'espèce la plus fréquemment trouvée dans les eaux à forte teneur en sel (Iltis, 1970 ; Congming *et al.*, 1999) . Elle atteint des densités considérables, l'eau prenant alors un aspect de 'soupe verte' très caractéristique. Poussée par le vent, elle forme le long des rives une sorte de pâte verte contenant jusqu'à 40 grammes d'algues séchées par litre (Léonard, 1968).

La variabilité morphologique de cette espèce a été étudiée pour la première fois par Rich (1931), à partir d'échantillons des lacs de la Rift Valley au Kenya : « largeur du trichome 6 à 11 μm , longueur des cellules 2-10 μm , séries de granules entre les cellules, parois entre les cellules, extrémité du trichome souvent légèrement atténuée ; largeur des spirales vers le milieu 36-60 μm , entre spires 15-16 μm , ce qui correspond à la description originale de *Arthrospira platensis* (Fox ,1999).

Plusieurs auteurs (Compère, 1974 ; Fox, 1999 ; Congming *et al.*, 1999) mentionnent que *Spirulina platensis* et *Arthrospira platensis* sont une même et seule espèce .

5. 3. Autres espèces :

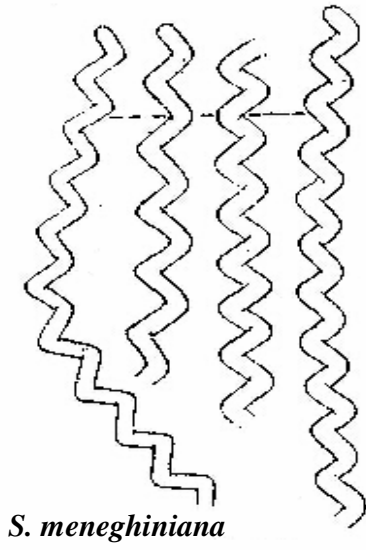
Le genre *Spirulina* regroupe d'autres espèces dont leurs descriptions et la distribution géographique sont présentées dans le tableau 2 :

Tableau 2 : distribution géographique des différentes espèces du genre *Spirulina* (Compère, 1974).

Espèces	Distribution géographique
<i>Spirulina corakiana</i>	Australie, en Afrique : Maroc, Tchad (Ennedi, Kanem).
<i>Spirulina labyrinthiformis</i>	Maroc, Algérie, Tunisie, Libye, Tchad .
<i>Spirulina major</i>	Maroc, Algérie, Tunisie, Égypte, Tchad, Zaïre, Kenya, Tanzanie, Mozambique, Natal, Transvaal, Madagascar.
<i>Spirulina subtilissima</i>	Maroc, Algérie, Libye, Egypte, Tchad (Kanem), Zaïre, Kenya, Tanzanie, Afrique du Sud.

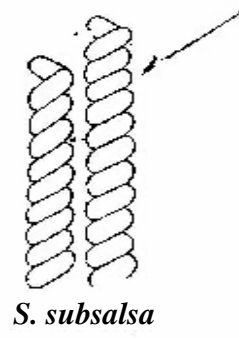
Le genre *Spirulina*

spirality of trichomes



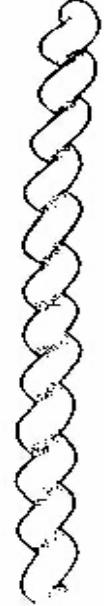
S. meneghiniana

morphology and structure of cell walls



S. subsalsa

trichome disintegration



S. princeps



S. major



S. tenuissima



S. subtilissima

Planche 2 : différentes morphologies de *Spirulina* sp. (d'après Geitler, 1932).

6. Le genre *Lyngbya* :

6. 1. Toxicité:

Des alcaloïdes dermatotoxiques, ont été rencontrés chez les cyanobactéries marines benthiques du genre *Lyngbya* ((Mynderse *et al.*, 1977). La présence de ces toxines en eau de mer provoque, chez le baigneur, des allergies et des irritations sévères, lorsqu'ils rentrent en contact avec les filaments, ils causent aussi des irritations cutanées, oculaires, respiratoires. Ces toxines se sont également révélées être de puissants promoteurs de tumeurs (Fujiki *et al.*, 1990). En revanche, en eau douce, aucune de ces toxines n'a été identifiée jusqu'à nos jours.

D'autres cyanobactéries du genre *Lyngbya* ont été à l'origine de dermatites et d'inflammations gastro-intestinales chez l'homme (Cardellina *et al.*, 1979) .

6. 2. Différentes espèces :

Le genre *Lyngbya* présente plusieurs espèces présentées dans le tableau 3 :

Tableau 3 : distribution géographique de différentes espèces du genre *Lyngbya* (Compère, 1974).

Espèces	Distribution géographique
<i>Lyngbya aerugineo-coerulea</i>	Maroc, Algérie, Tunisie, Égypte, Tchad, Cameroun, Angola, Tanzanie, Mozambique, Natal, Afrique du sud, Madagascar.
<i>Lyngbya bourrellyana</i>	Algérie, Tunisie, Égypte, Zaïre, Tanzanie, Tchad.
<i>Lyngbya diguetii</i>	Maroc, Guinée, Zaïre, Gabon, Tchad
<i>Lyngbya epiphytica</i>	Maroc, Tunisie, Tchad, Gabon, Zaïre, Tanzanie.
<i>Lyngbya foveolarum</i>	Maroc, Algérie, Tunisie, Tchad, Tanzanie, Mozambique.
<i>Lyngbya limnetica</i>	Maroc, Algérie, Tchad, Gabon, Zaïre, Tanzanie, Mozambique, Transvaal
<i>Lyngbya hieronymusii</i>	Maroc, Gabon, Zaïre, Tchad.
<i>Lyngbya major</i>	Algérie, Tunisie, Égypte, Tchad, Afrique du sud.
<i>Lyngbya martensiana</i>	Algérie, Tunisie, Guinée, Mali, Tchad, Gabon, Zaïre, Angola, Mozambique.
<i>Lyngbya retzii</i>	Maroc, Algérie, Mali, Tchad, Madagascar, Réunion, Maurice
<i>Lyngbya versicolor</i>	Madagascar, Réunion, Maurice, Tchad, Tanzanie, Angola.

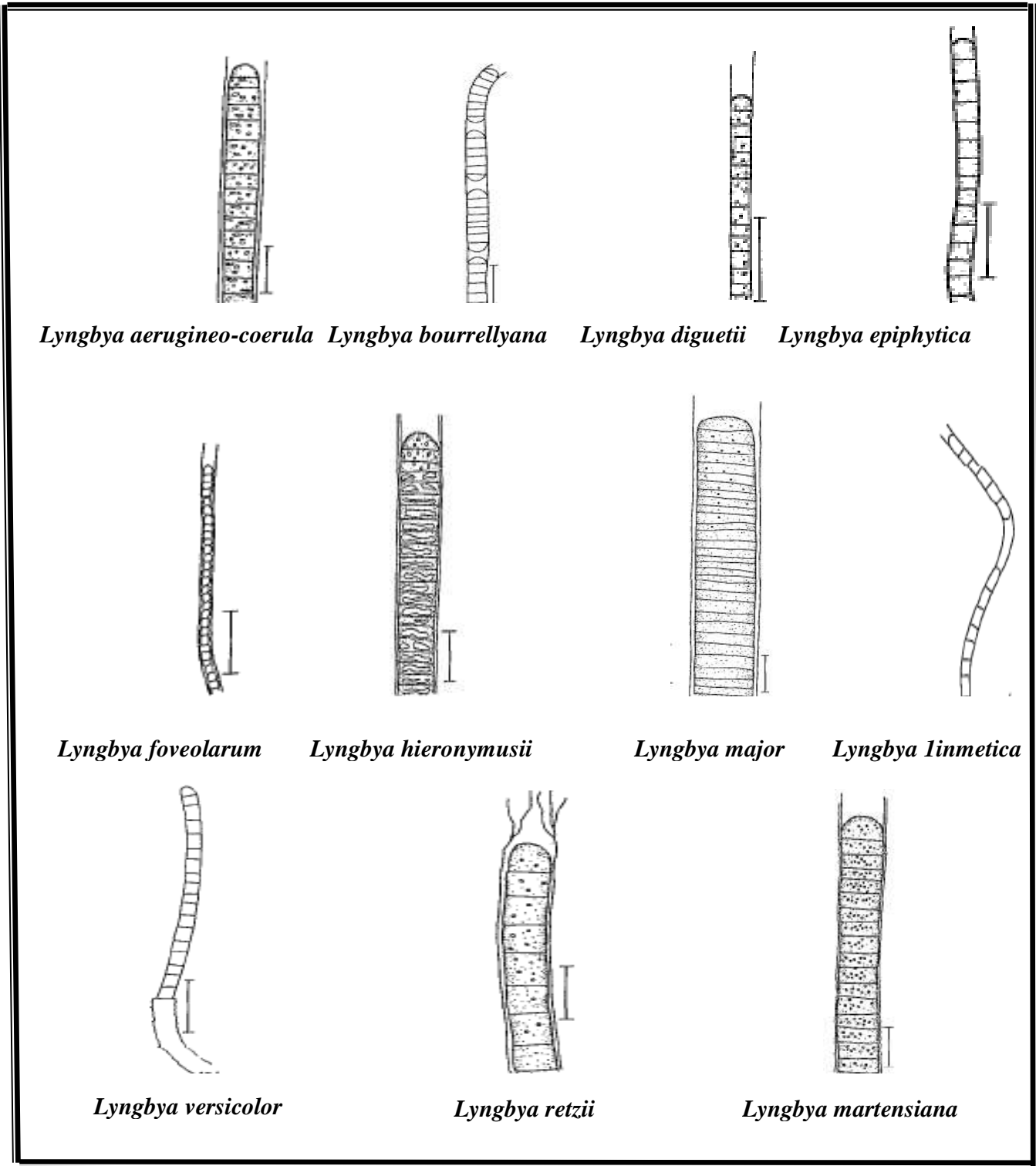


Planche 3 : différentes morphologies de *Lyngbya* sp. (d'après Compère, 1974).

7. Phylogénie moléculaire (*Arthrospira* et *Spirulina*) :

Pour l'identification des cyanobactéries 40 à 100 gènes dans le génome peuvent être utilisés comme des marqueurs phylogénétiques. Un des gènes les plus instructifs est le gène 16S rRNA ; car il est universellement présent dans les cyanobactéries et à une fonction conservée.

Des études phylogénétiques utilisant des séquences du gène 16S rRNA ont montré que beaucoup de genre de cyanobactéries unicellulaires filamenteuses non hétérocystées sont probablement polyphylétiques et ne peuvent pas être regroupés comme un taxon naturelle, alors que les genres hétérocystés forme un groupe monophylétique (Ballot, 2004).

La différenciation du genre *Arthrospira* des autres genres surtout le genre *Spirulina* n'a pas été toujours évidente, en raison de l'incorrecte unification des deux genres par Geitler (1932). Plusieurs études basées sur des caractères phénotypiques comme : paramètres de l'hélice (épaisseur, longueur), taille du trichome, paroi cellulaire, structure du membrane cellulaire, vésicules de gaz... etc., ont montré l'existence de différences entre les deux genres mentionnés précédemment (Desikachary, 1959 ; Hindak, 1985 ; Guglielmi *et al.*, 1993 ; Tomaselli, 1997). En plus des analyses génétiques plus récentes basées sur le gène 16S rRNA réalisées sur deux souches de *Arthrospira* (PCC 7345 et PCC 8005) en comparaison avec une autre souche du genre *Spirulina* (PCC 6313) (Ballot, 2004), ont révélé que le genre *Arthrospira* est très éloigné du genre *Spirulina* (Nelissen *et al.*, 1994 ; Manen et Falquet 2002 ; Litvaitis, 2002) et la séparation entre ces deux genres a été acceptée dans le *Bergey's Manual of Bacteriology* (Castenholz, 2001) . Il est important de préciser cette confusion car le genre *Arthrospira* est largement commercialisé sous le nom de 'Spirulina' comme supplément alimentaire pour les humains et les animaux (Muhling *et al.*, 2006).

D'autres études basées toujours sur le gène 16S rRNA réalisées sur les souches *Arthrospira fusiformis* et *Arthrospira maxima*, montrent une ressemblance à 100 % . Une autre ressemblance de 99.7% entre deux autres souches d'*Arthrospira* (PCC 7345 et PCC 8005). D'après Castenholz *et al.*, (2001) de telles hautes similitudes font que toutes les souches du genre *Arthrospira* ne sont probablement que des représentants d'une seule espèce (Ballot, 2004) et sans doute parler de variétés d'une même espèce dont le nom scientifique est *Arthrospira platensis* (Falquet, 1996).

8. Composition biochimique de *Arthrospira* :

8. 1. Protéines :

Les protéines représentent entre 50 et 70% du poids sec, ces valeurs sont tout à fait exceptionnelles, même parmi les micro-organismes. D'un point de vue qualitatif, ces protéines sont complètes, car tous les acides aminés essentiels figurent, ils représentent 47% du poids total des protéines (Bujard *et al.*, 1996). Parmi ces acides aminés essentiels, les plus faiblement représentés sont les acides aminés soufrés (méthionine et cystéine) (Aychunie *et al.*, 1996 ; Clément *et al.*, 1967 ; Bujard *et al.*, 1996) .

8. 2. Lipides :

• Lipides totaux :

En totalité ils représentent moins de 10% du poids sec (Bujard *et al.*, 1970). Ces lipides totaux peuvent être séparés en une fraction saponifiable (83%) et une fraction insaponifiable (17%) contenant essentiellement des paraffines, des pigments, des alcools terpéniques et des stérols (Clément, 1975 ; Santillan, 1974).

• Acides gras :

L'acide γ -linoléique représente chez *Arthrospira platensis* 40%, soit environ 4% du poids sec de spiruline ; de ce fait, *Arthrospira* peut être considérée comme une des meilleures sources connues d'acide γ -linoléique, après le lait humain et quelques huiles végétales peu courantes (Ciferri, 1983).

D'autres acides gras essentiels sont également présents, comme l'acide linoléique, 18:2 (12%). Notons aussi une forte proportion d'acide palmitique, 16:0, environ 25%. Quant aux sulfolipides tels que les sulfoquinovosyl-diglycérides (5% de la fraction saponifiable), ils suscitent actuellement de nouvelles recherches depuis qu'une activité protectrice contre l'infection des cellules par le VIH leur a été attribuée (Gustafson *et al.*, 1989). A noter encore l'absence d'acides gras au nombre de carbone impair (Clément, 1975) et une très faible teneur en acides gras à chaînes ramifiées (Bujard *et al.*, 1970), deux types de lipides non métabolisables par les animaux supérieurs.

8.3. Glucides :

Les glucides représentent entre 15 et 25% de la matière sèche. Les glucides simples sont en très faible quantité (glucose, fructose et le saccharose), l'essentiel des glucides assimilables est constitué de polymères tels que :

- glucosanes aminés (1.9% du poids sec)
- rhamnosanes aminés (9.7%)
- glycogène (0.5%) (Quillet, 1975).

Du point de vue nutritionnel, la seule substance glucidique intéressante par sa quantité chez *Arthrospira* est le méso- inositol phosphate qui constitue une excellente source de phosphore organique ainsi que d'inositol (350- 850 mg/kg mat. sèche) (Challem *et al.*, 1981 ; Nippon *et al.*, 1977) . Les polysaccharides présentent de multiples intérêts thérapeutiques, notamment dans la stimulation des mécanismes de réparation de l'ADN (Pang *et al.*, 1988) , dans son effet radio-protecteur et dans la neutralisation des radicaux libres (Qishen *et al.*, 1989) .

8.4. Acides nucléiques :

Les acides nucléiques représentent de 4 à 6% de la matière sèche. La proportion d'ADN serait d'un quart à un tiers par rapport à l'ARN. La teneur en acides nucléiques de *Arthrospira* est très inférieure à celle de la généralité des unicellulaires (Ciferri, 1983).

8.5. Vitamines:

- Bêta-carotène (provitamine A) :

Le β -carotène représente 80% des caroténoïdes présents dans *Arthrospira*, le reste étant composé principalement de physoxanthine et de cryptoxanthine (Palla *et al.*, 1969). On trouve entre 700 et 1700 mg de β -carotène et environ 100 mg de cryptoxanthine par kilo de spiruline sèche.

▪ **Tocophérols (vitamine E) :**

De 50 à 190 mg par kilo, (Challem *et al.*, 1981), (Nippon *et al.*, 1977), teneur comparable à celle des germes de blé. Les besoins quotidiens en vitamine E seraient de 15 U.I. (Guyton, 1986) soit 12 mg de tocophérols libres.

▪ **Vitamines du groupe B :**

Bien que moins riche que la levure en vitamines du groupe B (B12 excepté), *Arthrospira* constitue pourtant une bonne source de ces cofacteurs (tableau 4).

Tableau 4 : teneur en vitamines (Falquet, 1996).

Vitamine	Teneur (mg/kg)	Besoin/jour (adulte)
Thiamine (B1)	34-50	1.5 mg
Riboflavine (B2)	30-46	1.8 mg
Pyridoxine (B6)	5-8	2.0 mg
Cyanocobalamine (B12)	1.5 - 2.0	0.003 mg
Niacine	130	20 mg
Folate	0.5	0.4 mg
Panthoténate	4.6 - 25	6 - 10 mg
Biotine	0.05	0.1 - 0.3 mg
Acide ascorbique (C)	traces	5 - 30 mg

• **Vitamine B₁₂**

Il faut souligner la teneur exceptionnelle en **vitamine B12** (cobalamine) qui est de loin la vitamine la plus difficile à obtenir dans un régime sans viande car aucun végétal courant n'en contient. *Arthrospira* en est quatre fois plus riche que le foie cru, longtemps donné comme meilleure source. Il faut pourtant noter qu'il existe une controverse à propos de la biodisponibilité réelle du complexe B12 de *Arthrospira* (Harriman *et al.*, 1989 ; Rule *et al.*, 1994).

9. 6. Minéraux et oligo-éléments :

Tableau 5 : teneur en minéraux (Falquet, 1996).

Minéraux	Teneur (mg/kg)	Doses requises (mg/jour)
Calcium	1300 - 14000	1200
Fer	580 -1800	18
Phosphore	6700 - 9000	1000
Zinc	21 - 40	15

Magnésium	2000 - 2900	250-350
Cuivre	8 - 10	1.5 - 3
Chrome	2.8	0.5 - 2
Sodium	4500	500
Potassium	6400 - 15400	3500
Manganèse	25 - 37	5

Les minéraux spécialement intéressants chez *Arthrospira* sont le fer, le magnésium, le calcium, le phosphore et le potassium.

La très haute teneur en fer est à souligner, on doit noter également la présence de sélénium et de fluor, aux effets positifs certains (lutte contre les radicaux libres, prévention de la carie dentaire) (Falquet, 1996).

8. 7. Pigments :

Arthrospira contient de nombreux pigments photosynthétiques : Chlorophylle a, β carotène, phycocyanine, phycoérythrine et environ 11 caroténoïdes. Ces pigments sont activés par la lumière et servent ainsi d'antennes pour recueillir l'énergie lumineuse totale et la transmettre aux centres de réaction de la molécule de chlorophylle (Fox, 1999).

• La phycocyanine :

La phycocyanine, principal pigment de *Arthrospira* est le seul colorant bleu alimentaire, naturel autorisé en Europe. Ce pigment absorbe et capture les photons puis transforme cette énergie lumineuse en énergie électrochimique (Fox, 1999).

Plusieurs études attestent de nombreuses et diverses activités biologiques qu'offre la phycocyanine : antioxydant, antiradicalaire, anti-inflammatoire, anti-tumorale, amélioration du système immunitaire, hépatoprotection et détoxification. (Lamela *et al.*, 200).

Tableau 6 : composition chimique en pigments dans la Spiruline
(*Arthrospira*) (Belay, 1997).

Pigments	Teneur (mg /100g)
Caroténoïdes	370
Chlorophylle a	1000
Phycocyanine	14000

*Intérêts alimentaire,
thérapeutique, et
biotechnologique du
genre *Arthrospira**

1. Aspects alimentaires :

De par sa composition, *Arthrospira* nous offre plusieurs propriétés bénéfiques et nombreuses filières d'applications représentées comme suite :

Le genre *Arthrospira* est connu pour sa richesse en protéines mentionnées précédemment. Ces protéines ont en plus l'avantage d'être facilement assimilable par l'organisme, ce qui évite l'emploi de la cuisson qui altère les nutriments et les vitamines.

La digestibilité de *Arthrospira* est en plus accrue par l'absence de paroi cellulosique dans la cellule, remplacée par une enveloppe de muréine fragile.

L'efficacité protéique (PER) d'un aliment est déterminé par le rapport « Gain de poids de l'animal ou de l'individu / poids de protéines ingérées ». La protéine de référence est souvent le lactalbumine ou bien la caséine, laquelle présente un PER de 2.5; *Arthrospira* seule, au cours d'expériences menées sur le rat, a un PER de 1.90, tandis qu'accompagné de riz dans une proportion égale, cette valeur s'élève à 2.40 (Anusuya *et al.*, 1983). En plus elle figure aussi parmi les meilleures sources d'acide gras essentiel, ces acides sont des précurseurs des prostaglandines qui jouent le rôle de médiateurs chimiques dans les réactions inflammatoires et immunitaires. Cependant, *Arthrospira* a été recommandée comme supplément alimentaire en cas de carence en acides gras essentiels (Hudson *et al.*, 1974).

Des études cliniques ont également démontré l'excellente utilisation des caroténoïdes de *Arthrospira* chez l'homme (Annapurna *et al.*, 1991). De très faibles doses de *Arthrospira* suffisent à réduire considérablement les risques de cécité et d'atteintes neurologiques consécutives à la déficience en vitamine A chez l'enfant. Du fait du nombre croissant d'indices suggérant une série d'effets anti-cancéreux des caroténoïdes, divers extraits de spiruline ont été testés dans ce cadre. (Schwartz *et al.*, 1987 ; Schwartz *et al.*, 1988).

Parmi les éléments minéraux contenus dans *Arthrospira*, le fer est sans doute le plus intéressant, en effet la biodisponibilité du fer a été démontrée tant chez le rat que chez l'homme (Johnson *et al.*, 1986).

2. Aspects thérapeutiques :

Pour éliminer les radicaux libres dans l'organisme qui peuvent être à l'origine du cancer, notre organisme a besoin d'apports en vitamines anti-oxydantes, caroténoïdes et autres micronutriments. Le β -carotène, présent en quantité très importante dans *Arthrospira*, est l'un des principaux caroténoïdes impliqués dans ce système de défense de l'organisme (Fedkovic *et al.*, 1993).

En 1996, des chercheurs japonais découvrent et baptisent un extrait aqueux de spiruline particulièrement riche en calcium et en soufre, «le Calcium-spirulan» qui empêche la pénétration de la membrane cellulaire par certains virus comme le VIH-1, le Herpes Simplex, le virus de la grippe de type A et le virus de la rougeole. La phycocyanine est aussi connue pour son effet immunostimulant et elle est aussi utilisée en imagerie médicale comme traceur fluorescent. Il a été aussi prouvé que *Arthrospira* agit comme hypotenseur parce qu'elle contient de l'acide γ -linoléique (Sall *et al.*, 1999).

3. Aspects toxicologiques :

Arthrospira destinée à l'alimentation humaine est autorisée à la vente depuis de nombreuses années dans les pays industrialisés. Elle est classée GRAS (Generally Recognized As Safe) par la Food and Drug Administration aux Etats-Unis (Falquet, 1996).

La conservation des préparations de spiruline séchée (*Arthrospira*) ne semble poser aucun problème puisque ce produit paraît tout à fait résistant aux moisissures. Ainsi aucune détection d'*Aspergillus flavus* ni d'aflatoxine (sécrotée par ce dernier) dans des lots de spiruline (Jacquet, 1975).

4. Aspects biotechnologiques :

Les propriétés nutritionnelles de *Arthrospira* en font une source alimentaire qui mérite une attention particulière dans les pays en développement où se pose avec acuité un problème de disponibilités alimentaires et malnutrition. C'est pourquoi il est souhaitable de développer sa production aussi bien à l'échelle domestique pour la consommation familiale qu'au niveau des lacs et étangs. Le développement de la production de spiruline devra s'accompagner de la mise au point des systèmes de culture assurant une meilleure production (Sall *et al.*, 1999).

➤ Paramètres de culture :

L'environnement doit comprendre une zone de température convenant à *Arthrospira*, de la lumière fournissant l'énergie pour la photosynthèse, et de l'eau ; avec un certain mouvement de l'eau pour assurer une répartition moyenne de la lumière et des éléments nutritifs. Un équilibre acido-basique et un pH favorables doivent être maintenu, un rythme de récolte et d'ajout d'éléments nutritifs doit être établi et la culture doit se faire dans un système ou un bassin convenablement conçu.

La croissance optimale d' *Arthrospira* est obtenue pour une température comprise entre 34° à 40°C, et un pH de 8.5 à 10.5. Les éléments nutritifs essentiels doivent être en quantité suffisante (le manque d'un d'entre eux inhibe la croissance). Une forte intensité lumineuse conjuguée avec une forte agitation donne la croissance optimale, tous les filaments reçoivent des charges de lumière fréquentes et sont ensuite rapidement protégés d'une exposition trop longue par les autres filaments. En lumière et agitation faibles, la croissance est lente, mais la pigmentation est plus marquée, c'est-à-dire que la couleur est d'un vert plus foncé et le bleu de la phyco cyanine apparaît.

Le CO₂ étant moins soluble dans l'eau chaude que dans l'eau froide, l'élévation de la température réduit son taux, limitant ainsi la croissance. L'addition de CO₂ forme de l'acide carbonique, qui abaisse le pH. En absorbant le CO₂ par photosynthèse, les algues remontent le pH (Fox, 1999).

• Le milieu de culture :

Arthrospira se développe dans une eau à la fois salée et alcaline. L'eau utilisée pour le milieu de culture doit être de préférence potable ou au moins filtrée, le plus important étant l'élimination des algues étrangères. La composition des milieux de culture peut varier énormément, selon la disponibilité des produits chimiques

nécessaires à leur élaboration. Les limites de salinité et d'alcalinité permises sont généralement assez larges (salinité totale de 13 g/l) (Jourdan, 1997).

L'alcalinité est habituellement apportée par du bicarbonate de sodium (NaHCO_3), mais ce dernier peut être remplacé en partie par de la soude caustique ou du carbonate de sodium (Na_2CO_3) pour relever le pH initial du milieu de culture. Le milieu de culture contient des engrais pour assurer la croissance des spirulines : l'azote, le phosphore, le potassium sont les éléments classiques, mais le soufre, le magnésium, le calcium et le fer doivent aussi être ajoutés s'ils ne sont pas apportés en quantité suffisante par l'eau, le sel et les engrais. Une analyse préparatoire de l'eau et du sel est utile pour calculer la dose de Mg, Ca et Fer à ajouter car un excès de ces éléments est nocif. Les sources d'azote préférées des spirulines sont l'ammoniac et l'urée, mais ces produits sont toxiques au-delà d'une concentration limite à respecter impérativement. C'est pourquoi lors de la préparation du milieu de culture, utiliser un nitrate que l'on peut mettre à forte dose, constituant une réserve d'azote à long terme.

Le milieu Zarrouk, référence dans ce domaine, présente l'intérêt de s'adapter à presque toutes les souches de spiruline et simplifie considérablement le travail de l'algoculteur. Toutefois, ses constituants sont chers et ne sont pas toujours faciles à trouver (Jourdan, 1997).

▪ **Lumière et agitation :**

En diminuant l'éclairement on diminue aussi la photosynthèse totale, il faut ensemercer le bassin avec assez d'algues pour que la lumière ne puisse pas atteindre le fond du bassin ; et agiter suffisamment la culture pour que les filaments individuels ne restent pas plus d'une demi-minute à la surface en plein soleil, mais plongent et remontent fréquemment. Les roues à aubes constituent les systèmes d'agitation les plus utilisés; le but est de remuer l'eau (Fox, 1999).

Théoriquement, la photosynthèse la plus rapide serait obtenue avec une cadence des cycles ombre-lumière de mille par seconde ou plus. Pour le moment, ce n'est possible qu'en laboratoire. On peut tout de même obtenir une alternance de lumière et d'ombre toutes les quelques secondes, en mettant des déflecteurs dans le courant d'eau pour induire des turbulences; ainsi, on peut tripler facilement la production de biomasse, environ 30 g d'algue sèche par m^2 et par jour, par rapport à celle d'un bassin simplement agité par une roue à aubes (Fox, 1999).

➤ **Systemes de culture :**

• **Les photobioréacteurs :**

Un photobioréacteur est constitué d'un système de tubes en plastique transparent posé sur un plan incliné, long d'une dizaine de mètres et haut de 2m. A la base du plan, un réservoir en tôle peint en noir reçoit l'eau du tuyau de retour. Le soleil chauffe l'eau de ce réservoir. L'eau chaude, par convection, remonte dans les tubes transparents. Puis elle atteint un réservoir plat en tôle peinte à l'aluminium, placé en haut. Le refroidissement commence là. L'eau en ressort par des tubes formant des serpentins dans un échangeur. Recueillie par un tube transversal, l'eau retourne par le tuyau et boucle le cycle.

Le photobioréacteur est surtout utilisé pour la production de biomasse très pure, pour en extraire des molécules de haute valeur. Il ne convient pas à la culture de masse.

Les tubes, les bioréacteurs et les micros fermes sont employés dans les pays tempérés ou froids, où cette cyanobactérie ne peut pas croître naturellement. Ce sont des systèmes très chers, et seuls les photobioréacteurs tiennent la route économiquement (Fox, 1999).

▪ **Les fermes industrielles :**

La plus grande ferme industrielle se trouve aux Etats-Unis, en Californie ; c'est Earthrise Farm, qui couvre une superficie de 108 acres et approvisionne 40 pays en spiruline et produits dérivés. En 1996, sa production est estimée à 500 tonnes de poudre sèche.

La société Sosa Texcoco du Mexique ne fait pas de culture, elle récolte et transforme tout simplement. Elle est cependant le plus grand producteur mondial en comparant les productions cumulées de différents pays depuis 1975 (Henrikson, 1999).

Les systèmes avancés de bassins requièrent d'énormes superficies, jusqu'à 5000 m² pour une profondeur usuelle de 15 à 25cm. Ils nécessitent aussi plus d'investissement, mais produisent en conséquence de la spiruline de très bonne qualité. Parmi les pays qui utilisent ce système, on peut citer la Thaïlande, Hawaï, Taïwan, Israël (désert du Neguev), la Chine, l'Inde, le Vietnam et le Chili (Atacama desert) et à moindre échelle le Bangladesh, Cuba, la Martinique, le Pérou, le Brésil, l'Espagne et l'Australie. La production de la spiruline est de fait internationale, contrairement à ce que l'on pourrait croire (Henrikson, 1999 ; Fox, 1999).

Matériels & Méthodes

1. Matériel :

1. 1. Appareillages :

- ✚ Autoclave
- ✚ Bain-marie
- ✚ Bec bunsen
- ✚ Centrifugeuse
- ✚ Etuve
- ✚ Four Pasteur
- ✚ Microscope optique
- ✚ Réfrigérateur
- ✚ Spectrophotomètre
- ✚ Agitateur
- ✚ Lampe à UV
- ✚ Balance, pH mètre

1. 2. Verrerie et autres matériels :

1. 2. 1. Verrerie :

- ✚ Pipettes Pasteur stériles, micropipette (1000 μ l, 10 μ l), Pipettes graduées (1ml, 5ml, 10ml)
- ✚ Tubes à essai
- ✚ Béchers : 50ml, 1000ml
- ✚ Erlenmeyer de 250ml
- ✚ Cuve de chromatographie
- ✚ Boîte de Pétri
- ✚ Tubes à hémolyse en plastique
- ✚ Lames, lamelles, filtre en papier, anse de platine, spatule, compresse, pissette, entonnoir, papier absorbant

1. 2. 2. Autres matériels

- **Milieux de culture :**

- **Milieux classiques :**

- ✚ Milieu BG11 liquide et solide à différents pH (Rippka, 1988).
 - ✚ Milieu " Spir" (Aiba et Ogawa, 1977).
 - ✚ Milieu Jourdan (Fox, 1999).
 - ✚ Milieu MN (Rippka, 1988).
 - ✚ Milieu à base d'eau de mer (Charpy, 2004).

- **Autres milieux :**

- ✚ L'eau carbonatée des sources thermales de la région de Guelma et de Constantine (en variant le pH). La composition des milieux est donnée en annexe IV.

- **Colorants, antibiotiques et autres :**

- ✚ Solution de lugol
- ✚ Antibiotiques : pénicilline G, amoxicilline, céfazoline, ampicilline, oxacilline gentalline et le chloramphénicol.
- ✚ Ethanol à 90%, acétone à 90 %, méthanol et éther de pétrole.

2. Méthodes :

2. 1. Recherche du genre *Spirulina* dans différents biotopes :

Dans le cadre de notre étude, nous avons effectué plusieurs prélèvements d'eau et de sol dans des biotopes très divers (eaux douces, eaux salines et eaux thermales), afin de rechercher puis isoler les formes filamenteuses et spiralées appartenant au genre *Spirulina*, le protocole expérimental et les différentes étapes réalisés sont comme suit :

2. 1. 1. Présentation des sites de prélèvement et échantillonnage :

2. 1. 1. 1. Eaux douces :

• Lac Tonga :

Le lac Tonga est situé à une latitude de 36°53' Nord, une longitude de 08° 31'Est, et une altitude de 2,2 mètres.

C'est un étang d'eau douce qui communique avec la mer par le canal artificiel de la Messida, d'une superficie d'environ 2700 hectares.

Trois prélèvements d'eau de surface dans du lac Tonga ont été réalisés le 29.04.2007, dans trois points différents dans le lac : point 1, point 2 et point 3 ; prélevé chacun dans une bouteille d'une capacité de 1,5 l.

• Lac Noir :

Le lac Noir est situé au Nord– Est Algérien, à une latitude 36° 51' Nord et une longitude de 08°12' Est. Ce lac est situé dans le complexe des zones humides d'El-Kala, et comprend une tourbière sous-jacente, présentant une superficie de 5 hectares, formés de deux bassins. (Boumezbeur *et al.*, 2003).

Un seul prélèvement d'eau a été réalisé le 29.04.2007 dans une bouteille d'une capacité de 1.5 l, pleine d'eau de surface.

• Lac bleu :

Le lac Bleu est situé à une latitude de 36°53' Nord, une longitude de 8° 20' Est. Ce lac, situé sur la berge-Est du Mellah, est une dépression interdunaire d'eau douce alimentée par la remontée de la nappe phréatique et des eaux de pluies qui s'infiltrent à travers les sables des dunes qui l'entourent (Boumezbeur *et al.*, 2004).

Nous avons réalisé un seul prélèvement d'eau de surface, de couleur vert et très dense en filaments ; dans le lac Bleu le 08.05.2007, dans une bouteille d'une capacité de 1.5 l.

2. 1. 1. 2. Eaux salines :

• Sebkhha de Ain M'lila :

Nous avons réalisé deux types de prélèvements de la Sebkhha Zmoul à Ain M'lila.

➤ Un prélèvement d'eau de surface, effectué le 14.04.2007 dans une bouteille d'une capacité de 1.5 l ; de couleur rouge saturé en NaCl à partir du bassin de fabrication de sel ENASEL n°1 de la Sebkhha de Ain M'lila.

➤ Onze échantillons de sol, prélevés le 14.04.2007 dans des boites de Pétri, numérotés de 1 à 11. Chaque échantillon est composé de sol humide et de touffes de filaments très fins en surface, de couleur verte et noire.

• Lac El-Mellah :

El-Mellah est une lagune située à l'extrême Nord-Est de l'Algérie près de la ville d'EL-Kala à proximité de la frontière algéro-tunisienne à une latitude 36° 53' Nord, une longitude 8° 19' Est, d'une profondeur maximale de 6 m reliée à la mer par un chenal artificiel long de 900 m (Boumezbeur *et al.*, 2004).

Nous avons effectué deux types de prélèvements dans le lac El-Mellah :

➤ Un prélèvement d'eau de surface de couleur verte claire, réalisé le 21.04.2007 ; dans une bouteille d'une capacité de 1.5 l.

➤ Sept échantillons de sols prélevés dans des boites de Pétri, numérotés de 1 à 7. Chaque échantillon est composé d'algues vertes humides.

2. 1. 1. 3. Eaux thermales :

• Sources thermales de la région de Guelma :

Nous avons réalisé sept prélèvements d'eau à partir des sources chaudes de Hammam Guelma le 16.05.2007 et le 19.05.2007 à partir des sources chaudes de la région de Guelma.

- Quatre flacons d'une capacité de 250 ml, remplis chacun d'eau thermale très dense en filaments verts, sont destinés pour la recherche et l'isolement du genre *Spirulina*.
- Trois bouteilles d'une capacité de 1.5 l, remplis chacun d'eau thermale très claire, sont utilisées comme milieux de culture.

• Sources thermales de la région de Constantine :

Quatre prélèvements d'eau ont été effectués le 24.05.2007, à partir des sources chaudes et carbonatées (Aïn Skhouna à Hamma Bouziane) de la région de Constantine

- Une bouteille d'une capacité de 1.5 l rempli d'eau de surface tirée claire, est réservée à la recherche et la mise en culture du genre *Spirulina*.

- Les trois autres bouteilles d'une même capacité, sont destinées à l'utilisation comme milieux de culture.

2. 1. 2. Observations microscopiques des échantillons :

L'examen microscopique est indispensable pour l'identification précise des genres et des espèces de cyanobactéries.

L'examen direct des échantillons permet d'apprécier la morphologie des cyanobactéries, leurs groupements, leur abondance, et d'observer leur mobilité (Rippka, 1988).

Dans notre étude, l'identification des genres des cyanobactéries est réalisée, selon la clé d'identification proposée par Castenholz, (2001) basée sur les caractères morphologiques des cultures pures.

Dans le but de chercher les formes filamenteuses et spiralées du genre *Spirulina* ; les échantillons d'eau et de sol sont observés au microscope optique le jour même du prélèvement selon la technique suivante.

- **Technique microscopique :**

- **Echantillons d'eau de surface :**

- Mettre quelques gouttes de l'échantillon naturel sur une lame.
- Ajouter quelques gouttes de lugol si il est nécessaire.
- Recouvrir avec une lamelle.
- Observer avec un objectif à immersion dans l'huile x 100.

- **Echantillons de sol :**

- Prélever quelques filaments en surface et mettre sur une lame.
- Ajouter quelques gouttes d'eau afin d'humidifier le frottis.
- Observer avec un objectif à immersion dans l'huile x 100.

2. 1. 3. Ensemencement :

Après avoir observer les différents échantillons d'eau et de sol au microscope optique, on procède directement à l'ensemencement qui doit se faire sur les différents milieux de culture spécifiques à la culture des cyanobactéries.

On utilise des milieux liquides et gélosés spécifiques aux cyanobactéries, le plus souvent le milieu BG11 (Rippka, 1988), et d'autres milieux plus sélectifs recommandés pour la recherche systématique du genre *Spirulina* dans les échantillons naturels.

L'ensemencement doit se faire pour isoler la ou les cyanobactéries en cause en obtenant des cultures pures et bien distinctes (Rippka, 1988)

NB : Nous avons réalisé l'ensemencement des différents échantillons le jour même du prélèvement.

2.1.3.1. Echantillons des eaux douces :

○ Technique

Chaque échantillon d'eau est soigneusement homogénéisé; un volume précis de 1ml d'eau brute de chaque échantillon des différents lacs est prélevé à l'aide d'une micropipette, puis mis dans des tubes contenant le milieu BG11 (Rippka, 1988) à deux pH.

La méthode de la mise en culture de différents échantillons des eaux douces est détaillée dans le tableau 7 et schémas 1, 2 et 3 :

Tableau 7 : mise en culture des échantillons des eaux douces pour la sélection du genre *Spirulina*.

Sites de prélèvement	Echantillons	Milieu BG11	Technique d'ensemencement	Nombre de tubes ensemencés
Lac Tonga	Echantillon d'eau de surface	Liquide (pH 7)	1ml de d'eau brute dans 10ml de milieu de culture	2 tubes / échantillon
		Liquide (pH 10)	Idem	2 tubes / échantillon
	Echantillon d'eau de surface	Solide (pH 7)	ensemencement par stries	Une boîte de Pétri / échantillon
Lac Noir	Echantillon d'eau de surface	Liquide (pH 7)	1ml de d'eau brute dans 10ml de milieu de culture	2 tubes
		Liquide (pH 10)	Idem	2 tubes
	Echantillon d'eau de surface	Solide (pH 7)	ensemencement par stries	Une boîte de Pétri
Lac Bleu	Echantillon d'eau de surface	Liquide (pH 7)	1ml de d'eau brute dans 10ml de milieu de culture	2 tubes
		Liquide (pH 10)	Idem	2 tubes

○ Conditions de croissance :

Après ensemencement, l'ensemble des tubes et des boîtes de Pétri, sont incubés à une température de 30 °C, sous lumière blanche assurée par une lampe de puissance de 9W en respectant une photopériode (obscurité 16h / lumière 8h) pendant plusieurs jours.

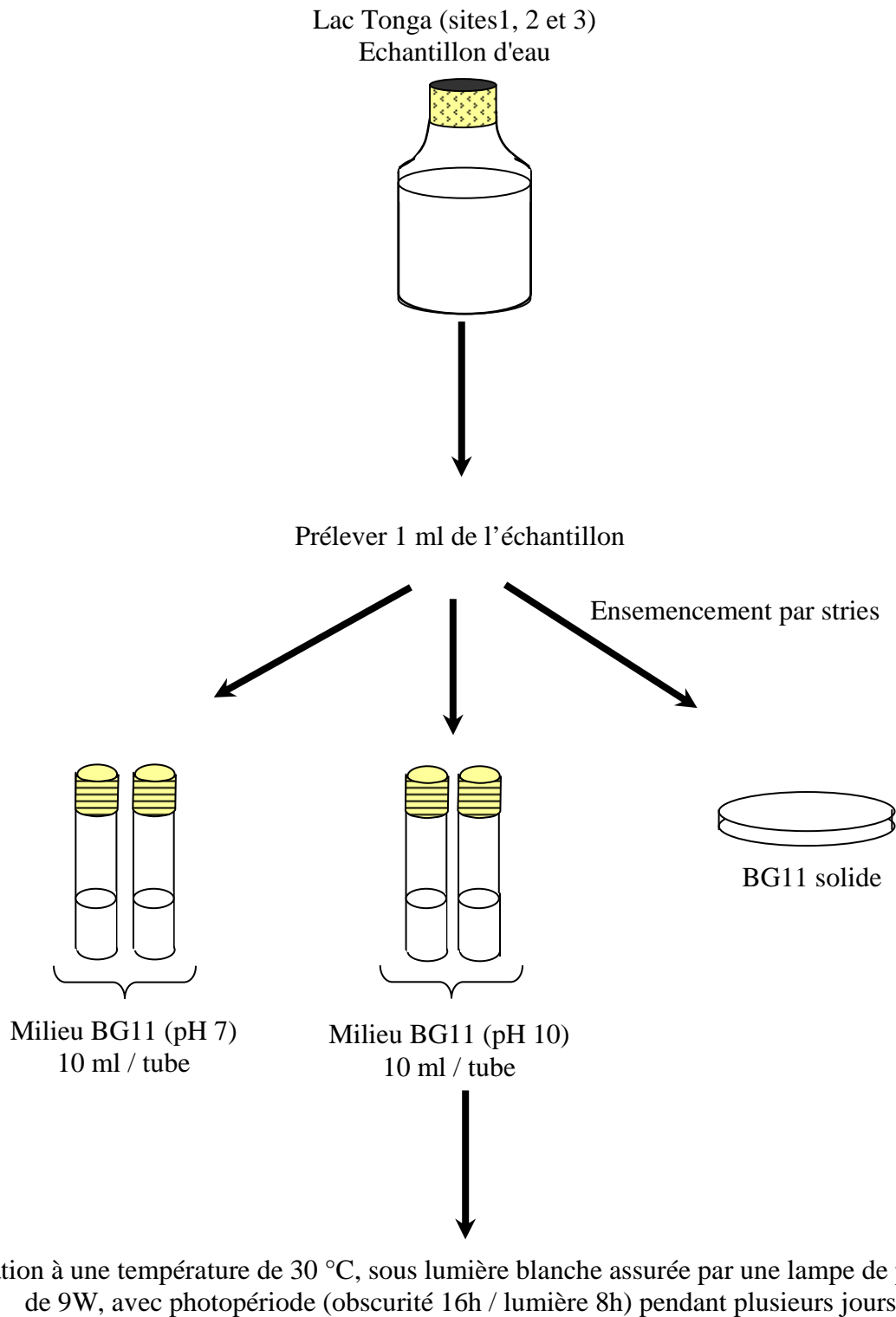
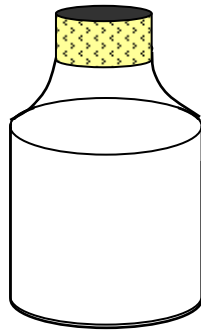


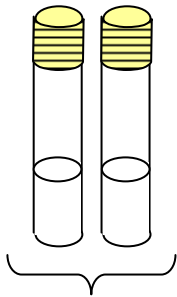
Schéma 1 : mise en culture des échantillons d'eau du lac Tonga pour la sélection du genre *Spirulina*

Lac Noir
Échantillon d'eau

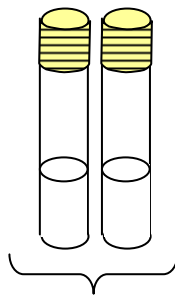


Prélever 1 ml de l'échantillon

Ensemencement par stries



Milieu BG11 (pH 7)
10 ml / tube



Milieu BG11 (pH 10)
10 ml / tube



BG11 solide

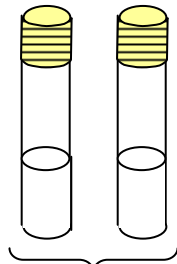
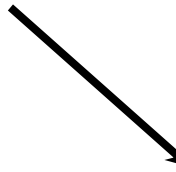
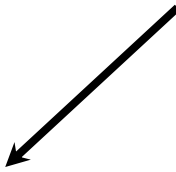
Incubation à une température de 30 °C, sous lumière blanche assurée par une lampe de puissance de 9W, avec photopériode (obscurité 16h / lumière 8h) pendant plusieurs jours.

Schéma 2 : mise en culture de l'échantillon d'eau du lac Noir pour la sélection du genre *Spirulina*

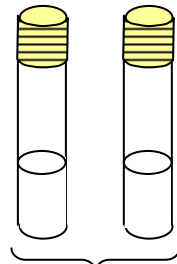
Lac Bleu
Échantillon d'eau (riche en algues vertes)



Prélever quelques filaments d'algues vertes



Milieu BG11 (pH 7)
10 ml / tube



Milieu BG11 (pH 10)
10 ml / tube



Incubation à une température de 30 °C, sous lumière blanche assurée par une lampe de puissance de 9W, avec photopériode (obscurité 16h / lumière 8h) pendant plusieurs jours.

Schéma 3 : mise en culture de l'échantillon d'eau du lac Bleu pour la sélection du genre *Spirulina*.

2.1. 3.2. Echantillons des Eaux salines :

- **Sebkha de Ain M'lila :**

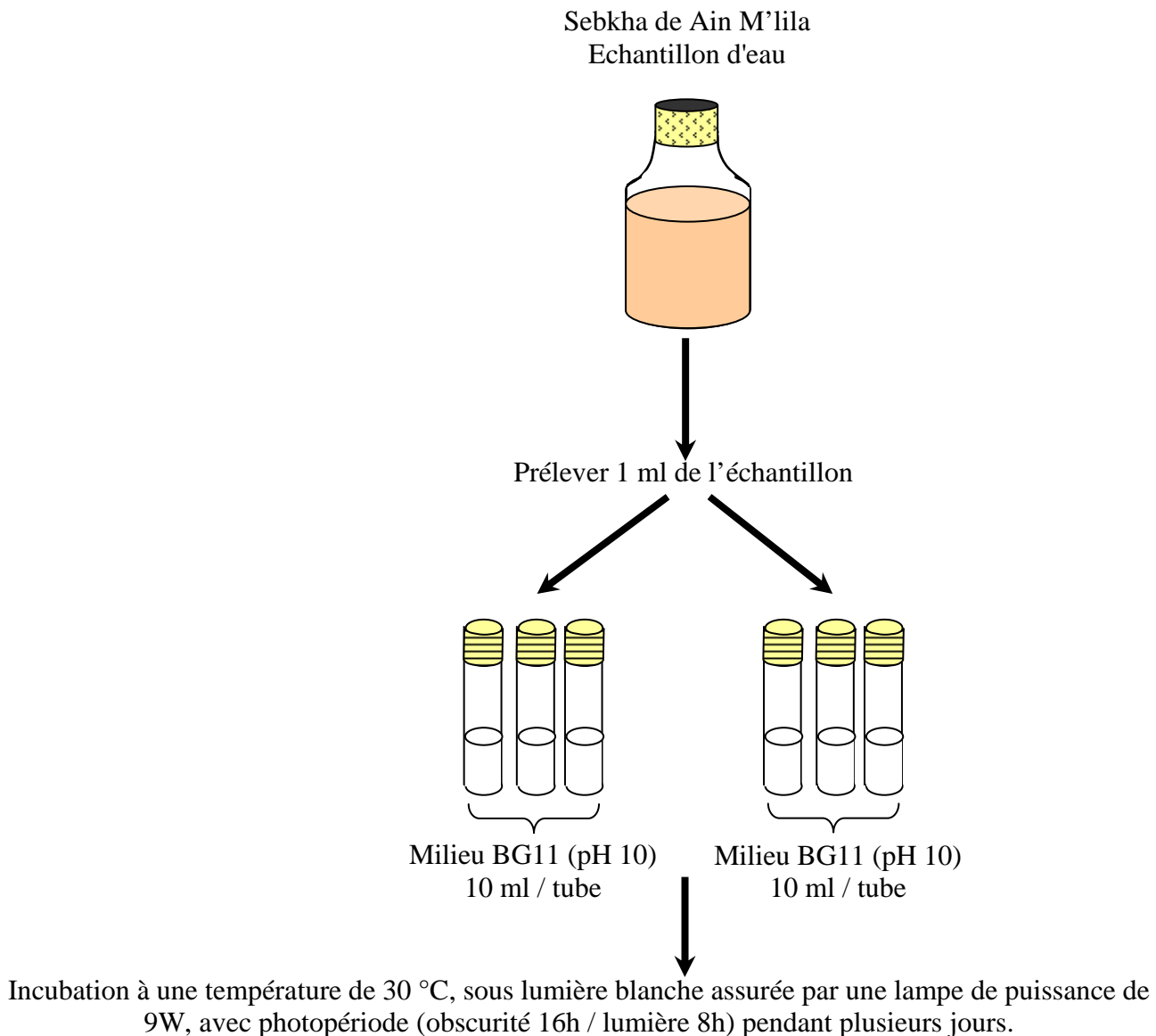
- **Echantillon d'eau :**

- **Technique :**

A son arrivé au laboratoire, et après homogénéisation de l'échantillon, 1ml d'échantillon d'eau de la Sebkha de Ain M'lila, est prélevé à l'aide d'une pipette, puis mis dans des tubes contenant le milieu BG11 selon le protocole du schéma 4.

- **Conditions de croissance :**

Une foisensemencés, l'ensemble des tubes sont incubés à 30 °C (Rippka, 1988), sous lumière blanche assurée par une lampe de puissance de 9W, en respectant une photopériode (obscurité de 16 / lumière de 8h) pendant plusieurs jours.



➤ **Echantillon de sol :**

Les échantillons de sol sont prélevés sur le site de la Sebkha asséchées. Les croûtes riches en sel et légèrement humides, sont prélevés et stockés dans des boîtes de Pétri afin de garder leur humidité. Ces croûtes sont riches en algues vertes.

○ **Technique :**

La technique consiste à couper un carré de 0.5 cm dans les croûtes (filaments sous forme de touffes de couleur verte et noire, en surface de chaque échantillon), ensuite mettre dans des tubes contenant 10 ml du milieu BG11 liquide à pH 7 et pH 10 (voir schéma 5).

NB : Les échantillons n^{os} 1, 2, 4, 6 et 7, sontensemencés le jour même du prélèvement alors que les échantillons n^{os} 9 et 11, sont mis en culture le 22.04.2007, une semaine après l'échantillonnage après conservation de l'échantillon au réfrigérateur.

○ **Conditions de croissance :**

Une foisensemencés, les tubes sont incubés à 30 °C, sous lumière blanche assurée par une lampe de puissance de 9W, en respectant une photopériode (obscurité 16h / lumière 8h) pendant plusieurs jours.

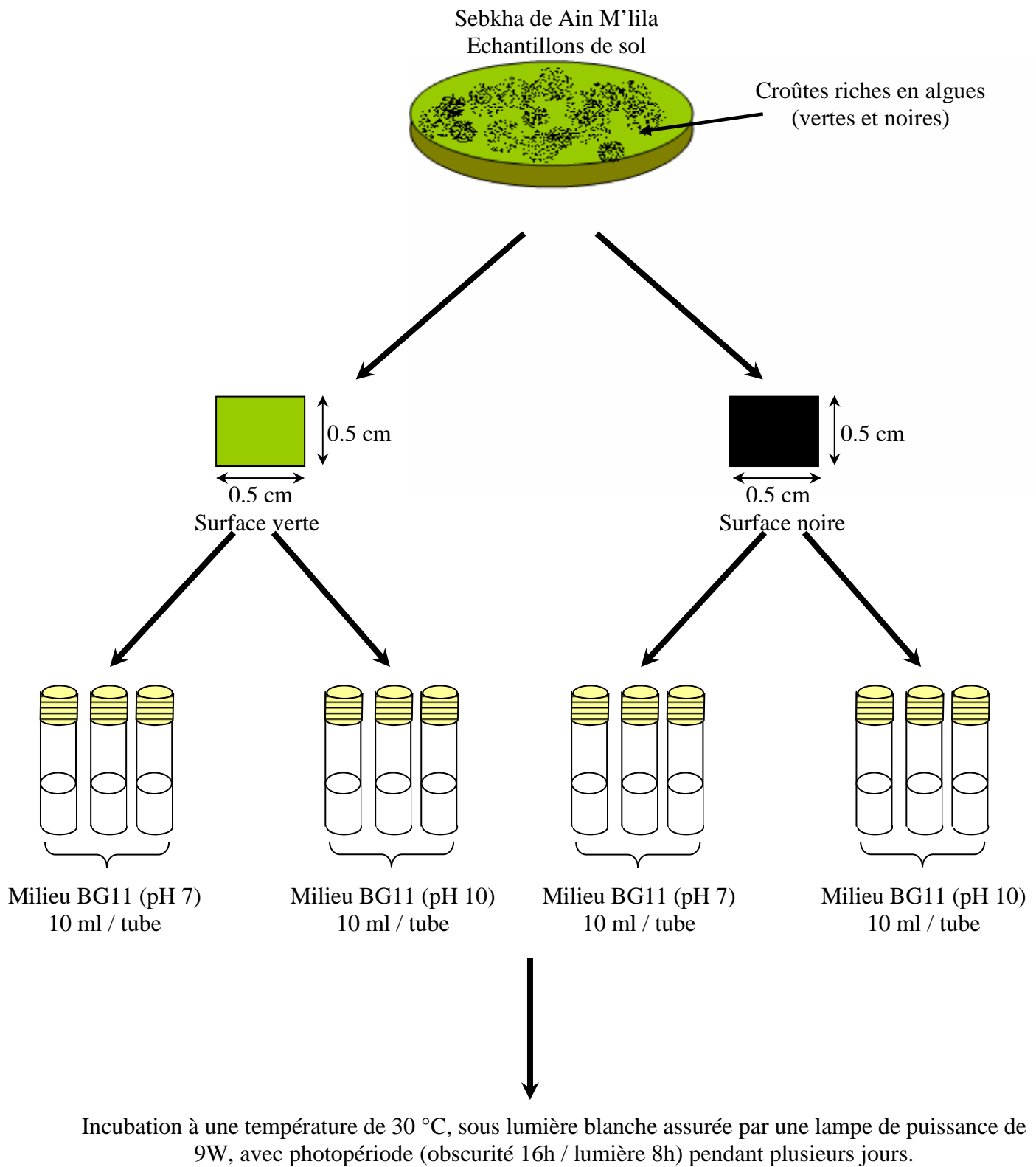


Schéma 5 : mise en culture des échantillons de sol de Sebkha de Ain M'lila pour la sélection du genre *Spirulina*

- **Lac El-Mellah :**

- **Technique :**

La technique d'ensemencement est la même que celle employée pour l'échantillon d'eau de surface de Sebkhass de Ain M'lila, elle est détaillée dans le tableau 8 et les schémas 6 et 7 :

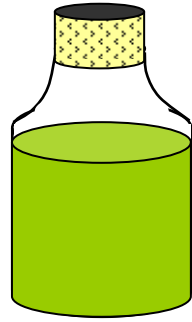
Tableau 8 : mise en culture de l'échantillon d'eau du lac El-Mellah pour la sélection du genre *Spirulina*

Echantillons	Milieu BG11	Technique d'ensemencement	Nombre de tubes ensemencés
Echantillon d'eau de surface	Liquide (pH 7)	1ml de d'eau brute dans 10ml de milieu de culture	3 tubes
	Liquide (pH 10)	idem	3 tubes
	Solide (pH 7)	ensemencement par stries	3 boite de Pétri
Echantillons de sol	Liquide (pH 7)	prélever quelques filaments de chaque échantillon et les mettre dans 10ml de milieu de culture	2 tubes / échantillon
	Liquide (pH 10)	Idem	2 tubes / échantillon

- **Conditions de croissance :**

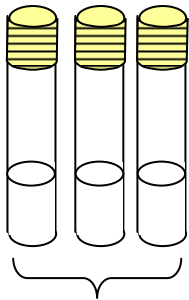
Incuber à 30 °C (Rippka, 1988), sous lumière blanche assurée par une lampe de puissance de 9W, en respectant une photopériode (obscurité 16h / lumière de 8h) pendant plusieurs jours.

Lac El-Mellah
Echantillon d'eau

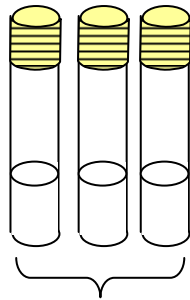


Prélever 1 ml de l'échantillon

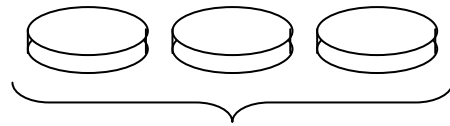
Ensemencement par stries



Milieu BG11 (pH 7)
10 ml à / tube



Milieu BG11 (pH 10)
10 ml à / tube

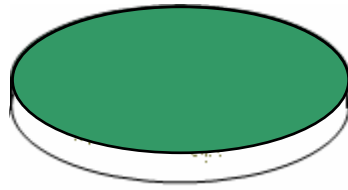


BG11 solide

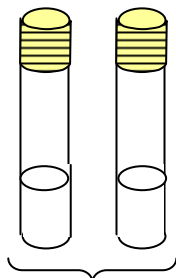
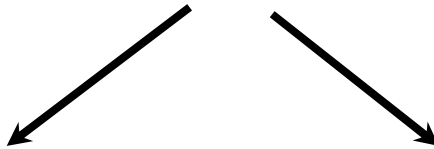
Incubation à une température de 30 °C, sous lumière blanche assurée par une lampe de puissance de 9W, avec photopériode (obscurité 16h / lumière 8h) pendant plusieurs jours.

Schéma 6 : mise en culture de l'échantillon d'eau du Lac El-Mellah pour la sélection du genre *Spirulina*

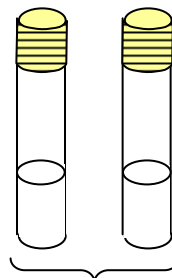
Echantillons du lac El-Mellah (riches en touffes d'algues)



Prélever quelques filaments verts



Milieu BG11 (pH 7)
10 ml / tube



Milieu BG11 (pH 10)
10 ml / tube



Incubation à une température de 30 °C, sous lumière blanche assurée par une lampe de puissance de 9W, avec photopériode (obscurité 16h / lumière 8h) pendant plusieurs jours

Schéma 7 : mise en culture des échantillons (touffes d'algues) du lac El-Mellah pour sélection du genre *Spirulina*

2. 4. 2. 3. Echantillons des eaux thermales :

- **Sources thermales de la région de Guelma :**

Dans le but d'obtenir une culture monoalgale du genre *Spirulina* à partir des échantillons d'eau (riches en algues verts) des sources thermales de Guelma, nous avons modifié et développé plusieurs méthodes d'isolement afin de sélectionner spécifiquement le genre *Spirulina*.

Les différentes méthodes employées sont représentées et détaillées comme suit :

- **Technique par sélection aux antibiotiques :**

Il s'agit d'une méthode classique en bactériologie, utilisable aussi pour les algues unicellulaires (Fox, 1999).

Le but de cette méthode est d'éliminer un grand nombre de contaminants par l'utilisation d'un ou plusieurs antibiotiques, car c'est l'étape la plus importante puisqu'elle conduira à la souche pure ce qui facilitera sa caractérisation.

Son principe repose sur la préparation de plusieurs solutions d'antibiotiques (S₁), (S₂), (S₃), (S₄), (S₅), (S₆) et (S₇).

On ensemence cinq flacons de 250ml contenant chacun 50ml de milieu culture, avec des filaments de couleur verte (échantillon de sources thermales de Guelma), prélevés avec une anse de platine.

Ajouter à chaque flacon, une concentration donnée en antibiotiques.

Le détaille de cette technique est présenté dans le tableau 9 et les schémas 8, 9 et 10 :

Tableau 9 : sélection aux antibiotiques.

Milieus de culture	Nombre de flacons ensemencés	Concentrations d'antibiotiques en mg /100ml de milieu de culture dans chaque flacon
BG11 liquide pH 8	Flacon n° 1 Flacon n° 2 Flacon n° 3 Flacon n° 4 Flacon n° 5	Pénicilline G : 34.96 ; Chloramphénicol : 3.49 Pénicilline G : 7.820 ; Chloramphénicol : 1.78 Pénicilline G : 9.000 ; Chloramphénicol : 0.90 Pénicilline G : 4.520 ; Chloramphénicol : 0.45 Pénicilline G : 2.170 ; Chloramphénicol : 0.27

Tableau 9 (suite) :

Milieux de culture	Nombre de flacons ensemencés	Concentrations d'antibiotiques en mg/100ml de milieu de culture dans chaque flacon
BG11 liquide pH 9	Flacon n° 1 Flacon n° 2 Flacon n° 3 Flacon n° 4 Flacon n° 5	Pénicilline G : 34.96 ; Chloramphénicol : 3.49 Pénicilline G : 17.82 ; Chloramphénicol : 1.78 Pénicilline G : 9.000 ; Chloramphénicol : 0.90 Pénicilline G : 4.520 ; Chloramphénicol : 0.45 Pénicilline G : 2.170 ; Chloramphénicol : 0.27
" Spir" liquide	Flacon n° 1 Flacon n° 2 Flacon n° 3 Flacon n° 4 Flacon n° 5	Pénicilline G : 34.96 ; Chloramphénicol : 3.49 Pénicilline G : 17.82 ; Chloramphénicol : 1.78 Pénicilline G : 9.000 ; Chloramphénicol : 0.90 Pénicilline G : 4.520 ; Chloramphénicol : 0.45 Pénicilline G : 2.170 ; Chloramphénicol : 0.27
BG11 liquide pH 8.5	Flacon n° 1 Flacon n° 2 Flacon n° 3 Flacon n° 4 Flacon n° 5	Pénicilline G : 34.96 ; Chloramphénicol : 3.49 Pénicilline G : 7.82 ; Chloramphénicol : 1.78 Pénicilline G : 9.000 ; Chloramphénicol : 0.90 Pénicilline G : 4.520 ; Chloramphénicol : 0.45 Pénicilline G : 2.170 ; Chloramphénicol : 0.27
Milieu Jourdan pH 8.5	Flacon n° 1	Pénicilline G : 51.45; Chloramphénicol : 5.14
BG11 liquide à pH 8	Flacon n° 1 Flacon n° 2 Flacon n° 3	Pénicilline G : 51.45; Chloramphénicol : 5.14 Pénicilline G : 51.45; Chloramphénicol : 5.14 Pénicilline G : 51.45; Chloramphénicol : 5.14
BG11 liquide pH 9	Flacon n° 1 Flacon n° 2	Pénicilline G : 51.45; Chloramphénicol : 5.14 Pénicilline G : 51.45; Chloramphénicol : 5.14
BG11 liquide à pH 9	Flacon n° 1 Flacon n° 2 Flacon n° 3 Flacon n° 4 Flacon n° 5 Flacon n° 6 Flacon n° 7	Pénicilline G:67.34 ; Chloramphénicol : 6.73 Amoxicilline:51.45;Chloramphénicol :5.14 Céfazoline:51.45 ;Chloramphénicol :5.14 Ampicilline:51.45 ;Chloramphénicol :5.14 Oxacilline:51.45 ;Chloramphénicol :5.14 Gentalline:51.45 ;Chloramphénicol :5.14 PénicillinG:8.57 ;Amoxicilline:8.57 ;Céfazoline:8.57 ; Ampicilline:8.57;Oxacilline:8.57;Gentalline:8.57 Chloramphénicol :5.14

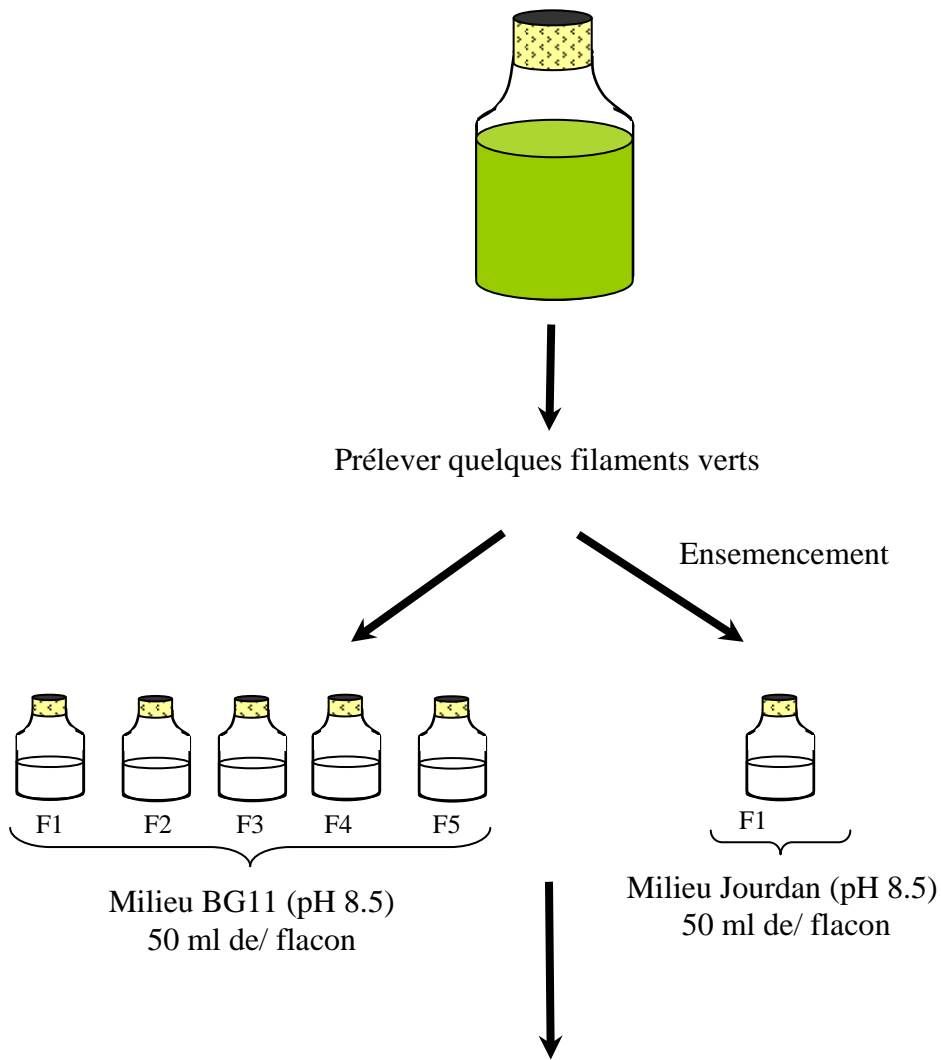
NB : La composition des solutions d'antibiotiques est donnée en annexe IV.

o **Conditions de croissance :**

Incuber les différents flacons à une température de 36 °C, sous lumière blanche assurée par une lampe de puissance de 9W en respectant une photopériode (obscurité 16h / lumière 8h) pendant plusieurs jours (Rippka, 1988).

Les sept flacons du dernier milieu sont incubés d'abord à une température de 36 °C à l'obscurité pendant 24h (Fox, 1999), puis sont remis dans les mêmes conditions de culture que les autres flacons.

Sources thermales de Guelma
Echantillon d'eau (très dense en filaments)



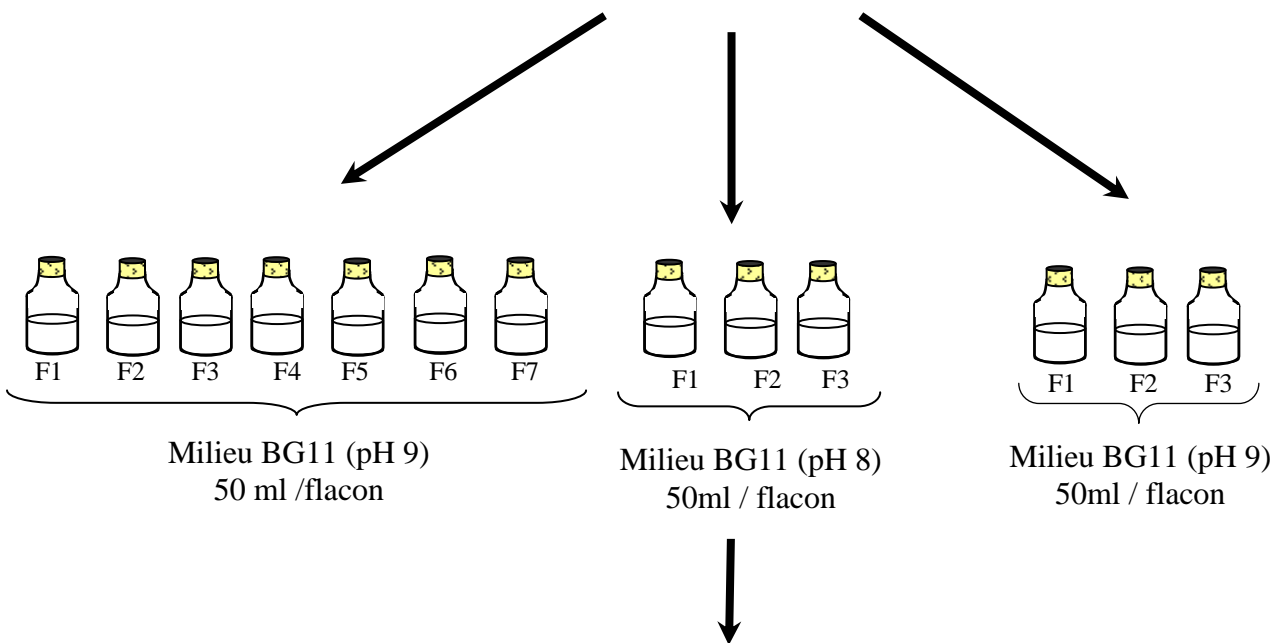
Incubation à $T=36\text{ }^{\circ}\text{C}$, sous lumière blanche assurée par une lampe de puissance de 9W, avec, photopériode (obscurité 16h / lumière 8h) pendant plusieurs jours pendant plusieurs jours.

Schéma 9 : technique par sélection aux antibiotiques sur milieu BG11 (pH 8.5), et milieu Jourdan.

Sources thermales de Guelma
Echantillon d'eau (très dense en filaments)



Prélever quelques filaments verts



Incubation à $T=36\text{ }^{\circ}\text{C}$, sous lumière blanche assurée par une lampe de puissance de 9W avec photopériode (obscurité 16h / lumière de 8h) pendant plusieurs jours

Schéma 10 : technique par sélection aux antibiotiques sur milieu BG11 (pH 9 et 8).

○ **Technique par ensemencement sur milieu BG11 après lavage des filaments :**

Le principe de la technique est l'élimination des contaminants, par plusieurs lavages avec l'eau distillée, puis procéder à l'ensemencement sur les milieux de culture. Les différentes étapes réalisées sont :

- Prélever à l'aide d'une anse de platine quelques filaments verts à partir de l'échantillon. Laver par la suite avec l'eau distillée stérile (10 fois).
- Mettre les filaments lavés dans 3 flacons contenant chacun 50ml de milieu BG11 (pH 9), ajouter ensuite à chaque flacon 3ml de la solution d'antibiotique S₈ (annexe IV, p. 109) (schéma 11).

○ **Conditions de croissance :**

Incuber à 36 °C, sous lumière blanche assurée par une lampe de puissance de 9W en respectant une photopériode (obscurité 16h / lumière de 8h) pendant plusieurs jours (Rippka ,1988).

○ **Technique par ensemencement sur eau thermale de Guelma après lavage des filaments :**

Même principe de la méthode précédente ; elle consiste à réaliser les étapes suivantes

- Prélever les filaments verts, laver avec l'eau distillée stérile et procéder à 10 lavages successifs.
- Mettre les filaments dans 2 flacons contenant chacun 50ml d'eau de Guelma.
- Ajouter à un des deux flacons (F₁) 3ml de la solution d'antibiotique S₁ (annexe IV, p. 109) (schéma 11).

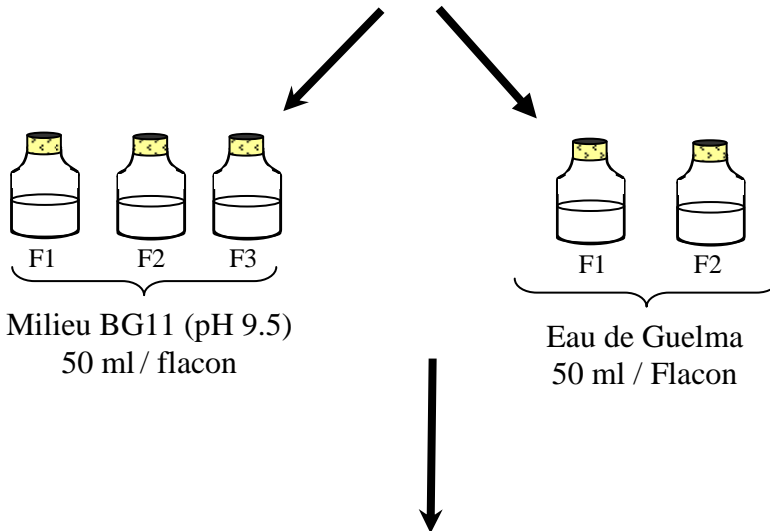
○ **Conditions de croissance :**

Incuber à 36 °C, sous lumière blanche d'une lampe de puissance de 9W en respectant une photopériode (obscurité 16h / lumière de 8h) pendant plusieurs jours (Rippka, 1988).

Sources thermales de Guelma
Echantillon d'eau (très dense en filament)



Prélever quelques filaments verts puis
laver à l'eau distillée 10 fois



Incubation à $T=36\text{ }^{\circ}\text{C}$, sous lumière blanche assurée par une lampe de puissance de 9W, avec photopériode (obscurité 16h / lumière de 8h) pendant plusieurs jours

Schéma 11 : technique par ensemencement sur milieu BG11 et eau de Guelma après lavage des filaments

○ **Isolement sélectif aux antibiotiques :**

Le principe de cette technique consiste à préparer une solution mère d'antibiotique (S_0). A partir de cette solution on prépare différentes dilutions. Les étapes réalisées sont :

- Prendre trois séries de 6 tubes vides stériles numérotés de 1 à 6.
- Répartir 6 ml de milieu BG11 (pH 9), dans les différents tubes.
- Ensemencer les différents tubes avec les filaments verts prélevés à partir de l'échantillon d'eau thermale.
- Ajouter 6ml de la solution d'antibiotique (S_0) au tube n°1 (annexe IV, p.109).
- prendre 6ml du contenu de ce tube et les mettre dans le tube n° 2 .Répéter l'opération jusqu'au tube n° 6 de chaque série (schéma 12) (Palavas, 1985).

○ **Conditions de croissance :**

Incuber l'ensemble des tubes à température ambiante à 18 °C, sous lumière naturelle pendant plusieurs jours.

Sources thermales de Guelma
Echantillon d'eau (riche en filaments verts)

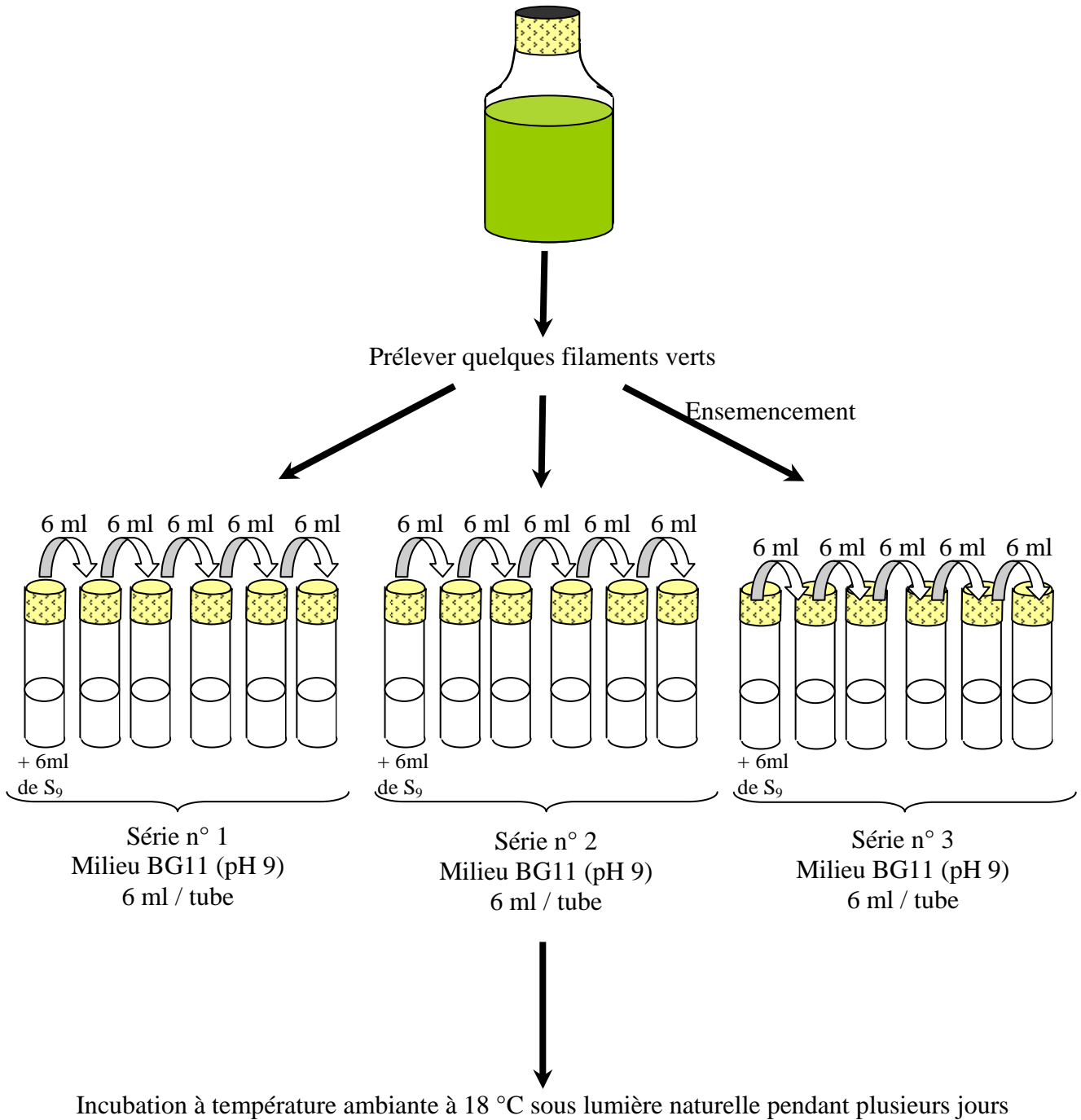


Schéma 12 : isolement sélectif aux antibiotiques

○ **Isolement par ensemencement sur milieu alcalin et milieux à base d'eau de mer :**

Cette technique consiste à utiliser des milieux alcalins et des milieux à base d'eaux de mer. Ces milieux sélectifs sont le plus souvent recommandés pour la recherche et la sélection du genre *Spirulina* :

- Milieu MN
- Milieu à base d'eau de mer enrichie en : FeSO_4 , NaNO_3 , K_2HPO_4 .
- Milieu à base d'eau de mer enrichie en : FeSO_4 Urée, K_2HPO_4 .
- Eau carbonatée (pH 9) de Guelma.

Le principe de cette méthode est simple ; les filaments verts sont prélevés à partir de l'échantillon, puis sont mis dans les différents milieux de culture employés. La technique est détaillée dans le tableau 10 et schéma 13 :

Tableau 10 : isolement par ensemencement sur milieu alcalin et milieux à base d'eau de mer

Milieu de culture	Couleur des filaments ensemencés	Nombre de flacons des 250ml ensemencés
Milieu MN	Quelques filaments verts par chaque flacon	5 flacons
Milieu à base d'eau de mer enrichie en : FeSO_4 , NaNO_3 , K_2HPO_4	Idem	5 flacons
Milieu à base d'eau de mer enrichie en : FeSO_4 , Urée, K_2HPO_4	Idem	5 flacons
Eau carbonatée de Guelma (pH 9)	Idem	4 flacons

○ **Conditions de culture :**

Après ensemencement, les différents flacons sont incubés à une température de 36 °C, sous lumière blanche assurée par une lampe de puissance de 9W, en respectant une photopériode (obscurité 16h / lumière 8h) pendant plusieurs jours (Rippka, 1988).

- **Sources chaudes de la région de Constantine (Ain Skhouna) :**

- **Technique :**

10 ml d'échantillon naturel d'eau des sources thermales de Constantine, sont prélevés chaque fois et mise en culture dans deux flacons contenant chacun 100 ml du milieu BG11 liquide (un flacon à pH 7 et l'autre à pH 10) (schéma 14) .

- **Conditions de croissance :**

Incuber à une température de 36 °C, sous lumière blanche assurée par une lampe de puissance de 9W, en respectant une photopériode (obscurité 16h / lumière de 8h) pendant plusieurs jours (Rippka, 1988).

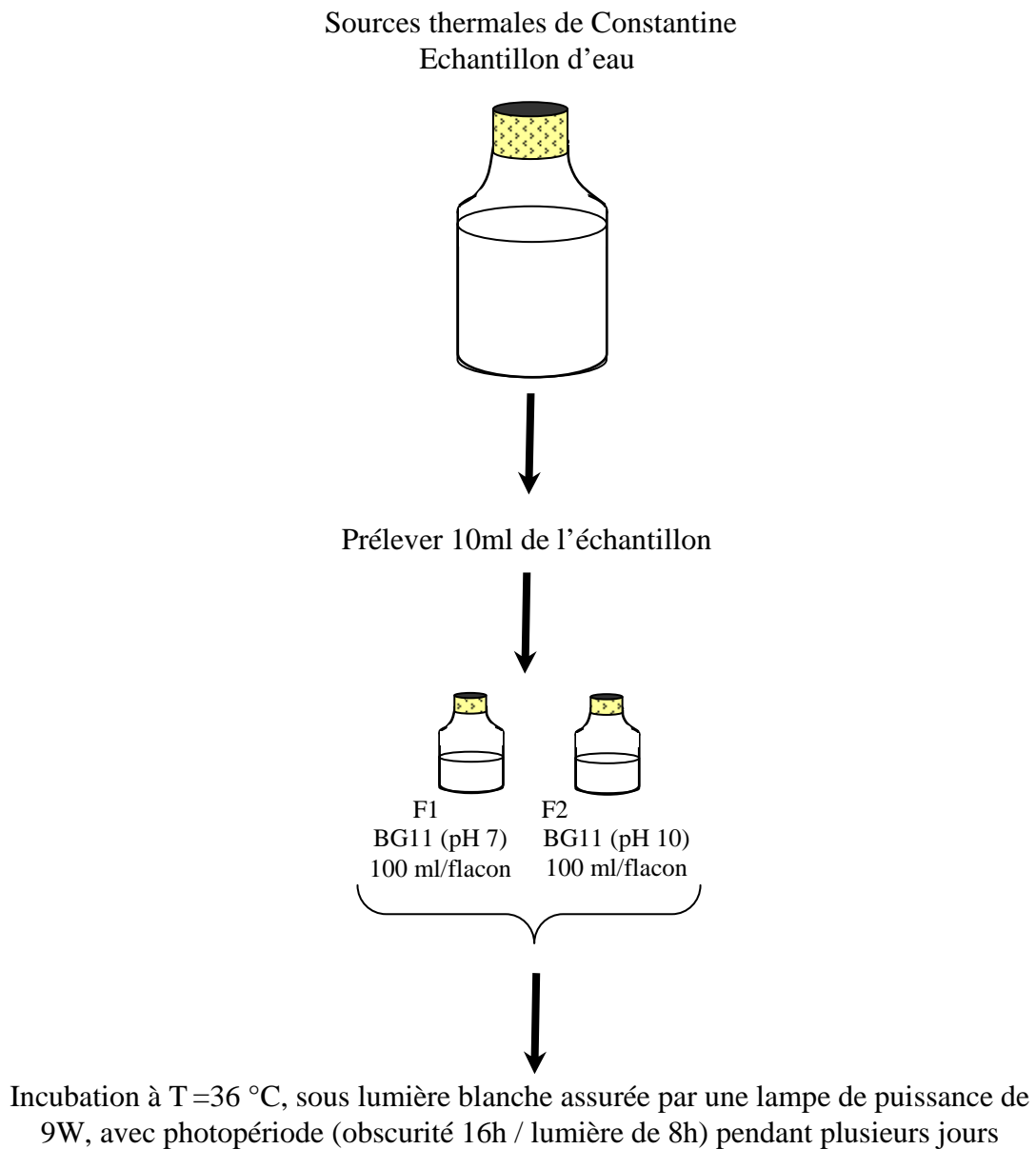


Schéma 14 : mise en culture de l'échantillon d'eau des sources thermales de Constantine

3. Culture de *Arthrospira* sp. PCC 8005 :

3. 1. Protocole expérimental :

3. 1. 1. But de la culture :

Dans le cadre de notre étude, nous avons réalisé la culture de la souche *Arthrospira* sp. PCC 8005 en suivant un protocole expérimental défini comme suit :

- Etudier la croissance de la souche *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur deux types de milieux de culture :
 - Milieux de culture classiques.
 - Milieux composés d'eaux carbonatées prélevées des sources thermales de la région de Guelma et de Constantine.
- Extraire et doser des pigments photosynthétiques, notamment la phycocyanine et la chlorophylle "a".

NB : La souche *Arthrospira* sp. PCC 8005 a été ramenée du laboratoire de Biotechnologie de l'Université Technologique de Compiègne (France).

3. 1. 2. Milieux de cultures testés :

Nous avons réalisé la culture de *Arthrospira* sp. PCC8005 sur sept milieux de culture différents :

- ✚ Milieu BG11 (pH 9.5)
- ✚ Milieu Zarrouk (pH 9.5)
- ✚ Milieu "Spir" (pH 8.7)
- ✚ Eau carbonatée naturelle des sources thermales de Guelma
- ✚ Eau carbonatée (pH 9.5) des sources thermales de Guelma
- ✚ Eau carbonatée naturelle des sources thermales de Constantine
- ✚ Eau carbonatée (pH 9.5) des sources thermales Constantine

3. 1. 3. Examen microscopique :

Cet examen se réalise en déposant, sur une lame porte-objet, une goutte de culture de la souche *Arthrospira* sp. PCC 8005 à examiner. Cette goutte est recouverte d'une lame couvre-objet.

La préparation est examinée à l'objectif à immersion (x100), après dépôt d'une goutte d'huile à immersion.

3. 1. 4. Préparation de l'inoculum :

À partir de culture pure de *Arthrospira* sp. PCC 8005, on prépare un inoculum pour l'ensemencement de la souche de référence sur les différents milieux de culture à tester.

○ **Technique :**

- Mettre 150 ml de milieu Zarrouk dans deux flacons de 250ml.
- Ensemencer chaque flacon avec 15 ml à partir de la culture pure de *Arthrospira* sp. PCC 8005 (schéma 15)
- Incuber pendant une semaine à une température de 35 °C, sous lumière blanche continue d'une lampe de puissance de 20W.

Culture pure de *Arthospria* sp. PCC 8005

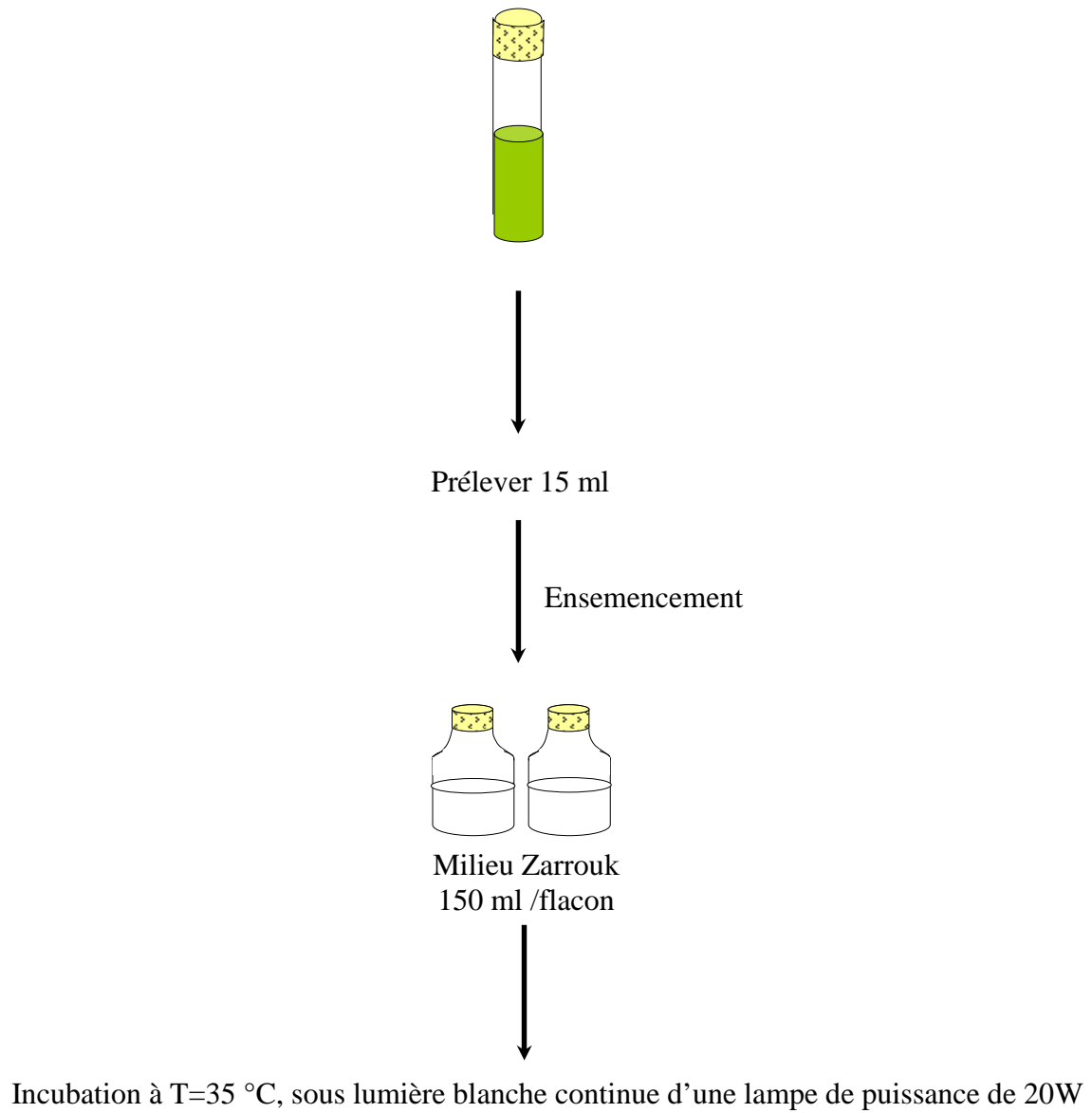


Schéma 15 : préparation de l'inoculum à partir de culture pure de *Arthrospira* sp. PCC 8005

3. 1. 5. Ensemencement :

○ Technique :

- Mettre 200 ml de chaque milieu de culture dans des Erlenmeyers de 250ml.
- Ensemencer les différents Erlenmeyers avec 20ml de l'inoculum de *Arthrospira* sp. PCC 8005 (schéma 16).

• Eclairage et température :

Les Erlenmeyers ainsiensemencés, sont incubés à une température de 35 °C sous lumière blanche continue d'une lampe de puissance de 20W, pendant plusieurs semaines.

NB : nous avons réalisé tous nos essais en double et dans des conditions de stérilité absolue.

Inoculum de *Arthospria* sp. PCC 8005

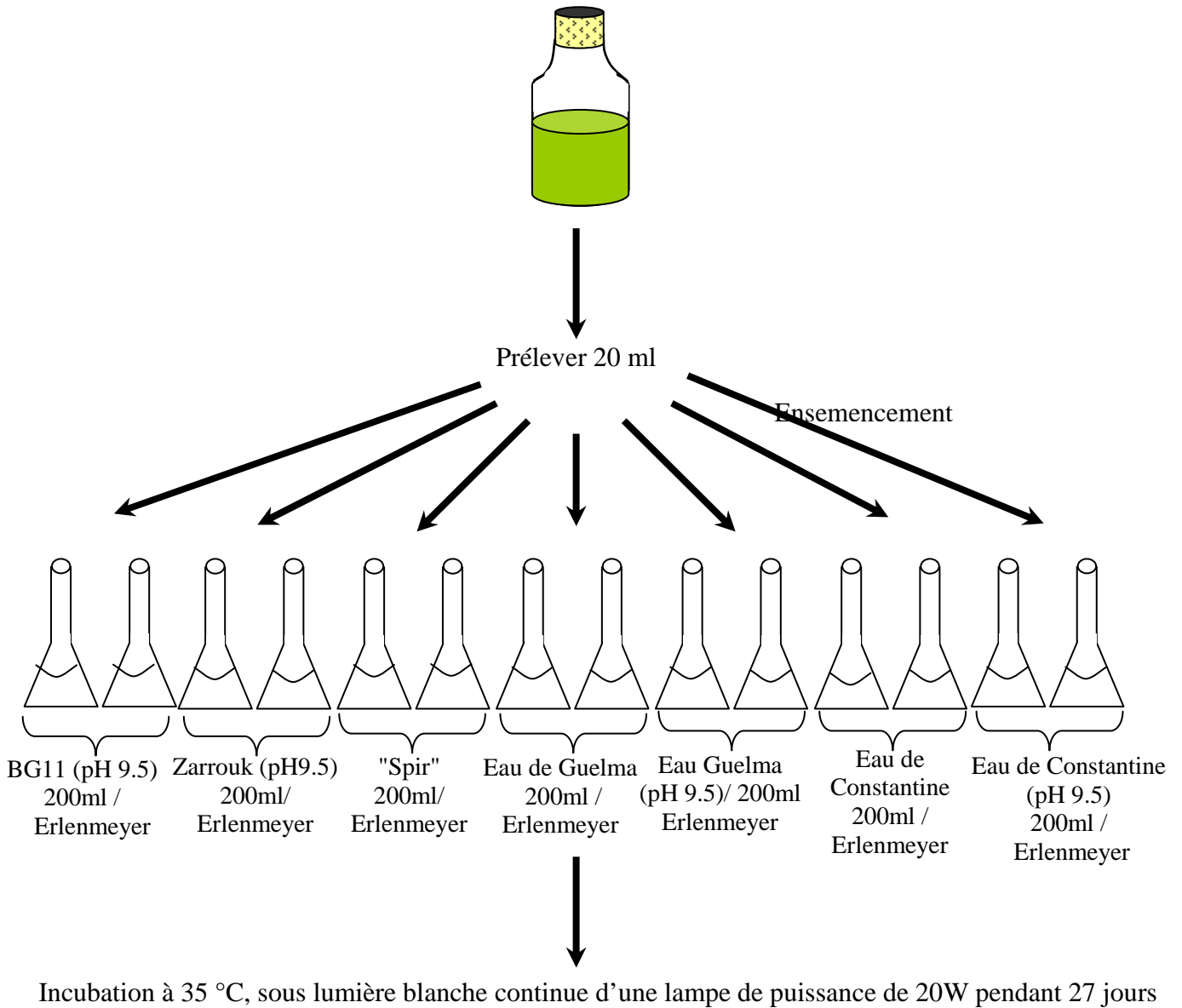


Schéma 16 : ensemencement de *Arthospria* sp. PCC 8005 sur différents milieux de culture.

3. 1. 6. Suivi de la croissance :

La croissance de la souche *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur les différents milieux de culture testés a été suivi tous les trois jours en mesurant la densité optique, et cela durant une période d'incubation de 27 jours.

○ Mesure de la densité optique (DO) :

Prélever 2ml de chaque culture de *Arthrospira* sp. PCC 8005 (pour chaque milieu à tester).

La croissance de la souche est suivie au spectrophotomètre par des mesures de la densité optique à une longueur d'onde de 560nm (Doke, 2005 ; Lamela *et al.*, 2000).

3. 1. 7. Dosage de la chlorophylle "a" :

○ Extraction de la chlorophylle "a" :

Un volume de 100 ml de chaque culture de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur différents milieux testés, sont filtrés (filtre en papier). Les filtres sont placés chacun dans 10 ml d'acétone à 90 % et maintenus à 4 °C à l'obscurité pendant une nuit pour l'extraction de chlorophylle "a".

Après cette période, les extraits sont filtrés puis leurs densités optiques sont mesurées au spectrophotomètre aux longueurs d'ondes : 663, 645, 630 nm et 750 nm (Brient *et al.*, 2001).

○ Dosage de la chlorophylle "a" :

L'équation trichromatique de SCOR UNESCO suivante est employée pour l'estimation de la chlorophylle "a" (Brient *et al.*, 2001), à partir de chaque culture de *Arthrospira* sp. PCC 8005.

$$\text{Chlorophylle "a" en mg/m}^3 \text{ ou } \mu\text{g/l} = \frac{(11,64 \cdot \text{DO à } 663\text{nm}) - (2,16 \cdot \text{DO à } 645\text{nm}) - (0,1 \cdot \text{DO à } 630\text{nm}) \cdot v}{V \cdot l}$$

DO = densité optique.

v = volume de l'extrait acétonique en ml

l = trajet optique en cm

V=volume de l'échantillon filtré en litres

3. 1. 8. Mise en évidence de la production de phycocyanine :

Les étapes nécessaires pour mettre en évidence la présence de phycocyanine dans chaque culture de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sont :

- Centrifuger 200ml de chaque culture différente à 6000 rpm pendant 10 minutes.
- Ajouter 10 ml d'une solution de tampon phosphate à pH=7.
- Congeler a -20 °C et décongeler à 4 °C de manière répétitive pendant 4 heures.
- Centrifuger les différents extraits obtenus à 6000 rpm pendant 10minutes.

Les différents surnagent sont par la suite utilisés pour :

- L'estimation des taux de pureté de la phycocyanine extraite de chaque culture en calculant chaque fois le rapport : A620/A280 par spectrophotomètre (Doke, 2005 ; Lamela *et al.*, 2000).
- Calculer la concentration totale de la phycocyanine (PC) présente dans chaque surnageant selon l'équation suivante (Lamela *et al.*, 2000) :

$$PC = (DO_{615} - 0.0474 * (DO_{652}) / 5.34$$

3. 1. 8. Mise en évidence de la production d'autres pigments :

La souche *Arthrospira* sp. PCC 8005 contient d'autres pigments photosynthétiques qui jouent un rôle de pigments accessoires dans la photosynthèse.

Ces pigments seront caractérisés et séparés par chromatographie sur couche mince (CCM) après extraction à partir de chaque culture.

➤ **Extraction des pigments :**

Ajouter 3ml d'un solvant d'extraction composé d'un mélange méthanol, éther de pétrole 2 :1 à chacun des sept filtres issus du dosage de chlorophylle, et maintenu à 4 °C à l'obscurité pendant une nuit.

➤ **Chromatographie sur couche mince de silice :**

Les différents extraits du solvant organique (méthanol / éther de pétrole) obtenus précédemment correspondant aux différentes cultures, contiennent un mélange de pigments qui doivent être séparés par chromatographie sur couche mince de silice ou TLC.

○ **Technique :**

- Avec un crayon, tracer une ligne à 2cm du bord de la plaque de chromatographie et indiquer où les différents extraits seront déposés.
- Avec une micropipette, prélever environ 100µl de chaque extrait à analyser et les déposer à leurs endroits respectifs sur la plaque et sécher avec un sèche-cheveux puis recommencer les dépôts plusieurs fois selon leurs intensités.
- Positionner la plaque dans la cuve qui contient le solvant de migration composé de 60 ml toluène et 40 ml d'acétone.
- Laisser migrer le front de solvant pendant 45min.
- Noter par un trait la hauteur atteinte par le solvant puis noter la couleur de chaque tache obtenue (Motten, 2004).

Résultats & Discussion

1. Recherche du genre *Spirulina* dans différents biotopes :

Dans ce présent travail, nous avons examiné l'ensemble des échantillons prélevés à partir des eaux douces, des eaux salines et des eaux thermales, dans le but de rechercher, isoler puis cultiver le genre *Spirulina*.

1. 1. Examen des échantillons des eaux douces :

1. 1. 1. Observations microscopiques :

Les caractères morphologiques des cyanobactéries dominantes observées dans les échantillons des eaux douces sont présentés dans le tableau 11 :

Tableau 11 : caractères morphologiques des cyanobactéries présentes.

Sites de prélèvement	Echantillon	Caractères morphologiques des cyanobactéries dominantes
Lac Tonga	Eau de surface	Couleur des colonies : verte Diamètre des colonies : 25-40µm Diamètre des cellules : 1-1.5µm Gaine : mucilage incolore Pseudovacuoles : nombreuses
Lac Noir	Eau de surface	Couleur des colonies : verte Diamètre des colonies : 20-40µm Diamètre des cellules : 1µm Gaine : mucilage incolore Pseudovacuoles : nombreuses
Lac Bleu	Eau de surface	Couleur des colonies : verte Diamètre des colonies : 30µm Diamètre des cellules : 1µm Gaine : mucilage incolore Pseudovacuoles : nombreuses

• Discussion :

D'après les résultats mentionnés précédemment (tableau 11), nous pouvons conclure que ces caractères morphologiques correspondent aux cyanobactéries du genre *Microcystis*.

Dans les échantillons prélevés à partir des eaux douces (lac Tonga, lac Bleu et lac Noir), il se pourrait que le genre *Spirulina* existe en très faible proportion, mais nous n'avons pas réussi à l'observer. Pour cela nous avons réalisé différentes étapes d'enrichissement dans le but de favoriser la croissance du genre *Spirulina*, si celui-ci se trouve dans l'échantillon.

1. 1. 2. Enrichissement sur le milieu BG11 :

Le milieu BG11 permet aussi la croissance et le développement du genre *Spirulina*, si les échantillons prélevés à partir des eaux douces contiennent ce genre (même en très faible proportion).

Les résultats des enrichissements sur le milieu BG11 des échantillons prélevés à partir des eaux douces et ce après une période d'incubation de 15 jours, sont présentés dans le tableau 12 et les photos 1 et 2 :

Tableau 12 : résultats de l'enrichissement des échantillons des eaux douces sur le milieu BG11.

Sites de prélèvement	Milieu BG11	Caractères morphologiques des cyanobactéries dominantes après enrichissement
Lac Tonga	Liquide (pH 7)	Couleur des colonies : verte Diamètre des colonies : 80µm Diamètre des cellules : 1µm. Gaine : mucilage incolore Pseudovacuoles : nombreuses
	Liquide (pH 10)	Couleur des colonies : verte Diamètre des colonies : 40-100µm Diamètre des cellules : 1µm Gaine : mucilage incolore Pseudovacuoles : nombreuses
	Solide (pH 7)	Petites colonies vertes
Lac Noir	Liquide (pH 7)	Couleur des colonies : verte Diamètre des colonies : 120µm Diamètre des cellules : 1µm Gaine : mucilage incolore Pseudovacuoles : nombreuses

Tableau 12 (suite) :

Sites de prélèvement	Milieu BG11	Caractères morphologiques des cyanobactéries dominantes après enrichissement
Lac Noir	Liquide (pH 10)	Couleur des colonies : verte Diamètre des colonies : 125µm Diamètre des cellules : 1µm Gaine : mucilage incolore Pseudovacuoles : nombreuse
	Solide (pH 7)	Petites colonies vertes
Lac Bleu	Liquide (pH 7)	Couleur des colonies : verte Diamètre des colonies : 50-65µm. Diamètre des cellules : 1µm. Gaine : mucilage incolore Pseudovacuoles : nombreuses
	Liquide (pH 10)	Couleur des colonies : verte Diamètre des colonies : 70µm Diamètre des cellules : 1µm Gaine : mucilage incolore Pseudovacuoles : nombreuses

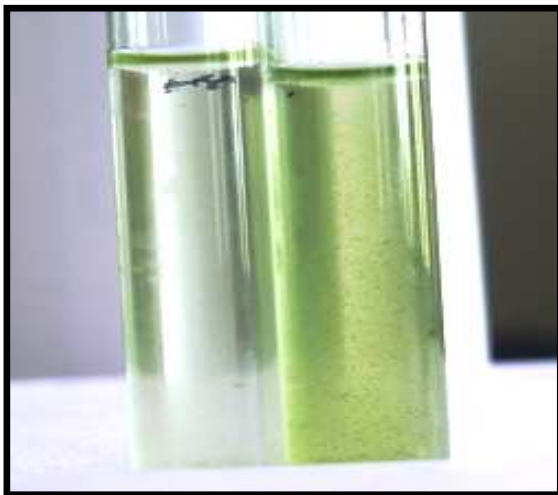


Photo 1 : culture de *Microcystis* sp. sur milieu BG11 (lac Tonga)



Photo 2 : culture de *Microcystis* sp. sur milieu BG11 (lac Noir)

- **Discussion :**

D'après les résultats des enrichissements (tableau 12) des différents échantillons prélevés à partir du lac Tonga, du lac Bleu et du lac Noir, nous remarquons la croissance et le développement d'un seul genre de cyanobactéries qui est *Microcystis* (Chroococcales), sur le milieu BG11 (pH 7 et pH 10).

Les différentes étapes d'enrichissement réalisées avec le milieu BG11 liquide et solide, n'ont pas permis le développement du genre *Spirulina*.

1. 1. 3. Conclusion :

Nous pouvons conclure que les échantillons prélevés à partir des eaux douces (lac Tonga, lac Noir et lac Bleu), avant et après enrichissement sur le milieu BG11 liquide (pH 7 et pH 10) et solide, ne renferment pas le genre recherché *Spirulina*.

1. 2. Examen des échantillons des eaux salines :

1. 2. 1. Observations microscopiques :

Les caractères morphologiques des cyanobactéries dominantes observées dans les échantillons des eaux salines, sont présentés dans le tableau 13 :

Tableau 13 : caractères morphologiques des cyanobactéries présentes.

Sites de prélèvement	Echantillon	Caractères morphologiques des cyanobactéries dominantes
Sebkha de Ain M'lila (eau continentale)	Eau de surface (marais salant)	Couleur des colonies : verte Diamètre des colonies : 45µm Diamètre des cellules : 1-1.5µm Gaine : mucilage incolore Pseudovacuoles : nombreuses
	Sol (croûtes riches en algues vertes)	Trichome : vert Diamètre : 16µm Longueur : 250µm Gaine : présente, épaisse Hormogonies : présente Pseudovacuoles : absentes Akinètes : absents Hétérocystes : absents

Sites de prélèvement	Echantillon	Caractères morphologiques des cyanobactéries dominantes
Lac El-Mellah (lagune)	Eau de surface	Couleur des colonies : verte Diamètre des colonies : 65-100µm Diamètre des cellules : 1µm Gaine : mucilage incolore Pseudovacuoles : nombreuses
	Touffes d'algues vertes	Couleur des colonies : verte Diamètre des colonies : 25-80µm Diamètre des cellules : 1-1.5µm Gaine : mucilage incolore Pseudovacuoles : nombreuses

- **Discussion :**

En fonction des résultats mentionnés précédemment (tableau 13), nous pouvons conclure que, les caractères morphologiques observés correspondent à la présence des cyanobactéries appartenant au genre *Microcystis* dans les échantillons prélevés à partir du lac El-Mellah (eau de surface et les touffes d'algues) et de la Sebkha de Ain M'lila (échantillon d'eau de surface). Cependant nous avons noté la présence de cyanobactéries filamenteuses appartenant au genre *Lyngbya* dans le cas des échantillons de sol prélevés de la Sebkha de Ain M'lila.

Comme le genre *Spirulina* peut être benthique, il est fortement possible de le retrouver notamment dans les échantillons de sol prélevés à partir de Sebkha de Ain M'lila et les touffes d'algues vertes prélevées de lac El-Mellah. Pour cela nous avons procédé à différentes étapes d'enrichissement des échantillons sur milieu BG11 liquide et solide, qui vont permettre la croissance du genre *Spirulina*.

1. 2. 2. Enrichissement sur le milieu BG11 :

1. 2. 2. 1. Echantillons de la Sebkha de Ain M'lila :

- **Echantillon d'eau :**

Les résultats des enrichissements de l'échantillon d'eau de surface de la Sebkha de Ain M' lila après une période d'incubation de 15 jours, sont présentés dans le tableau 14 :

Tableau 14 : résultats de l'enrichissement de l'échantillon d'eau.

Milieu BG11	Caractères morphologiques des cyanobactéries dominantes après enrichissement
Liquide (pH 7)	Couleur des colonies : verte Diamètre des colonies : 20-160µm Diamètre des cellules : 1-1.5µm Gaine : mucilage incolore Pseudovacuoles : nombreuses
Liquide (pH 10)	Couleur des colonies : verte Diamètre des colonies : 50-110µm Diamètre des cellules : 1-1.5µm Gaine : mucilage incolore Pseudovacuoles : nombreuses

▪ **Echantillons de sol :**

Les résultats de l'enrichissement des échantillons de sol (croûtes d'algues) de la Sebka de Ain M'lila après une période d'incubation de 15 jours, sont présentés dans le tableau 15 et les photos 3, 4 (coloration avec lugol), 5 et 6 :

Tableau 15 : résultats de l'enrichissement des échantillons de sol.

Milieu BG11	Caractères morphologiques des cyanobactéries dominantes après enrichissement
Liquide (pH 7)	Trichome : vert Diamètre : 16µm Longueur : 120µm-1.5mm Gaine : présente, épaisse Hormogonies : présents Pseudovacuoles : absentes Akinètes : absents Hétérocystes : absents
Liquide (pH 10)	Couleur des colonies : verte Diamètre des colonies : 80-200µm Diamètre des cellules : 1-1.5µm Gaine : mucilage incolore Pseudovacuoles : nombreuses

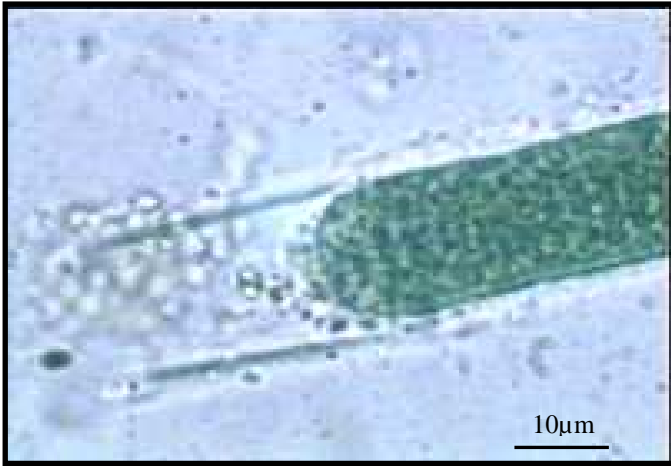


Photo 3 : *Lyngbya* sp. (Sebkha de Ain M'lila)

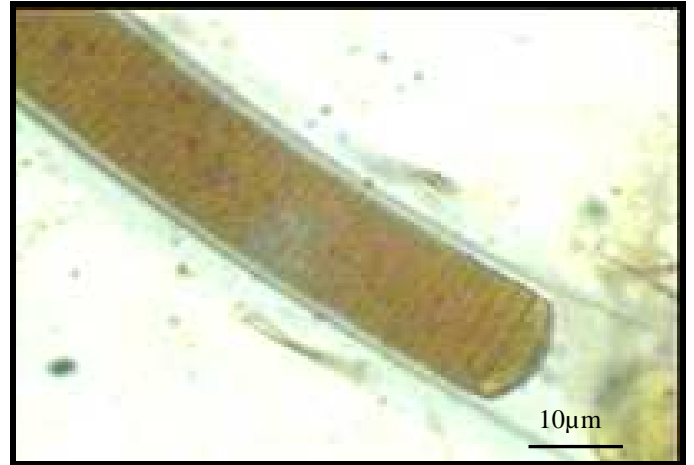


Photo 4 : *Lyngbya* sp. (Sebkha de Ain M'lila)



Photo 5 : culture de *Lyngbya* sp. sur milieu BG11 (pH 7)



Photo 6 : culture de *Lyngbya* sp. sur milieu BG11 (pH 10)

1. 2. 2. 2. Lac El-Mellah :

Les résultats de l'enrichissement des échantillons prélevés à partir du lac El-Mellah après une période d'incubation de 15 jours, sont présentés dans le tableau 16 :

Tableau 16 : résultats de l'enrichissement des échantillons du lac El-Mellah.

Echantillon	Milieu BG11	Caractères morphologiques des cyanobactéries dominantes après enrichissement
Echantillon d'eau	Liquide (pH 7)	Couleur des colonies : verte Diamètre des colonies : 50-135µm Diamètre des cellules : 1µm Gaine : mucilage incolore Pseudovacuoles : nombreuses
	Liquide (pH 10)	Couleur des colonies : verte Diamètre des colonies : 20-110µm Diamètre des cellules : 2.5-3µm Gaine : mucilage incolore Pseudovacuoles: nombreuses
	Solide (pH 7)	Petites colonies vertes
Touffes d'algues vertes	Liquide (pH 7)	Couleur des colonies : verte Diamètre des colonies : 20-200µm Diamètre de cellule : 1-2.5µm Gaine : mucilage incolore Pseudovacuoles : nombreuses
	Liquide (pH 10)	Couleur des colonies : verte Diamètre des colonies : 150µm Diamètre des cellules : 2.5µm Gaine : mucilage incolore Pseudovacuoles : nombreuses

• **Discussion :**

Les résultats des enrichissements des échantillons des eaux salines sur le milieu BG11 (pH 7 et pH 10), montrent la croissance et le développement d'un seul genre *Microcystis* à partir des échantillons prélevés de lac El-Mellah (eau de surface et touffes d'algues vertes) et de la Sebkha de Ain M'lila (échantillon d'eau de surface).

Cependant nous avons observé la croissance et le développement des genres *Lyngbya* (Oscillatoriales) et *Microcystis* (Chroococcales) dans le cas des échantillons de sol prélevés à partir de la Sebkha de Ain M'lila.

Concernant le genre *Lyngbya*, le milieu BG11 (pH 7 et pH 10) a permis un développement massif de ce genre, même après deux moins d'incubations (photos 5 et 6).

Les différentes étapes d'enrichissement réalisées avec le milieu BG11 liquide et solide, n'ont pas permis la croissance du genre *Spirulina*.

1. 2. 3. Conclusion :

D'après les résultats obtenus, nous pouvons conclure que les échantillons d'eau et de sol prélevés à partir des eaux salines (lac El-Mellah et Sebka de Ain M'lila) avant et après les étapes d'enrichissement sur le milieu BG11 (pH 7 et pH 10), ne renferment pas le genre recherché *Spirulina*.

1. 3. Examen des échantillons des eaux thermales :

1. 3. 1. Observations microscopiques :

Les caractères morphologiques des cyanobactéries dominantes observées dans les échantillons des eaux thermales, sont présentés dans le tableau 17 et la figure 2 (photo B : coloration avec lugol)

Tableau 17 : caractères morphologiques des cyanobactéries présentes.

Sites de prélèvement	Echantillon	Caractères morphologiques des cyanobactéries dominantes
Sources thermales de Guelma	Eau de surface	Couleur des colonies : verte Diamètre des colonies : 80-120µm. Diamètre des cellules : 1µm. Gaine : mucilage incolore Pseudovacuoles : nombreuses
Sources thermales de Guelma	Eau de surface	Trichome : Spirale Couleur : vert Diamètre : 2µm Longueur : 120-130µm Pseudovacuoles : absentes Akinètes : absents Hétérocystes : absents
Sources thermales de Constantine	Eau de surface	Absence de caractères morphologiques

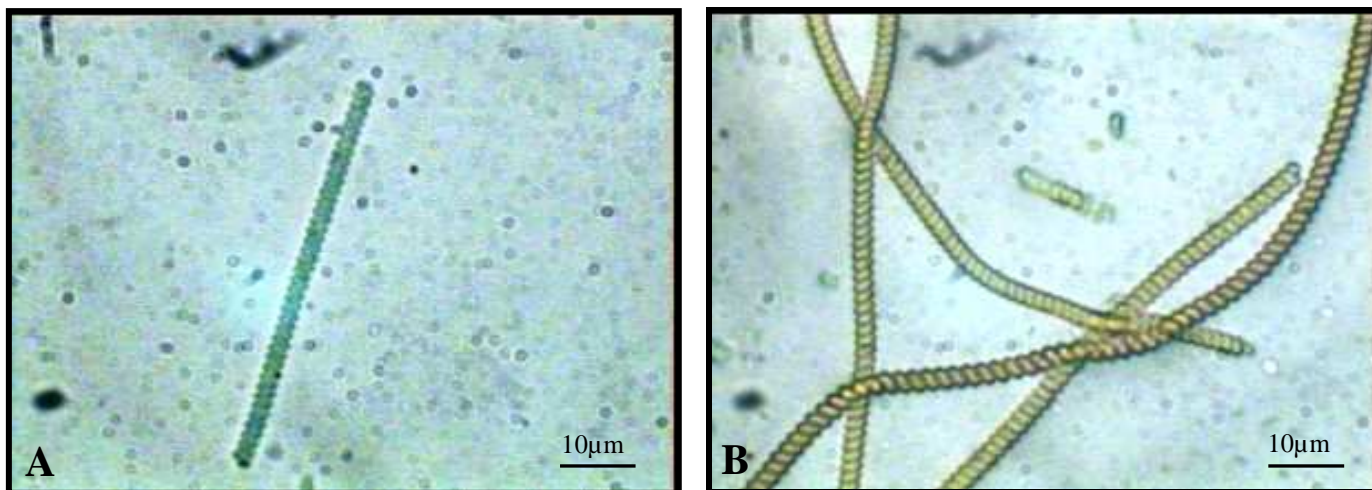


Figure 3 : morphologie de *Spirulina subsalsa* (A et B) (sources thermales de Guelma)

- **Discussion :**

D'après les résultats des observations microscopiques des échantillons des eaux thermales (tableau 17), nous pouvons conclure que les caractères morphologiques observés correspondent aux cyanobactéries appartenant aux genres *Microcystis* (Chroococcales) et *Spirulina subsalsa* (Oscillatoriales), dans les échantillons d'eau prélevés à partir des sources thermales de la région de Guelma.

La présence de l'espèce *Spirulina subsalsa* dans les échantillons d'eau de surface de Guelma, est certainement due à la température élevée ($T = 57\text{ }^{\circ}\text{C}$). Ce résultat va dans le même sens que l'étude de Ballot (2004) ; dans laquelle l'espèce *Spirulina subsalsa* a été trouvée dans plusieurs sources d'eaux chaudes dans le monde, à des températures supérieures à $50\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Dans le cas des échantillons des sources thermales de Constantine, nous avons noté l'absence totale de cyanobactéries.

Concernant les échantillons des sources chaudes de Guelma, nous avons procédé à plusieurs étapes d'isolement sur différents milieux de culture sélectifs, dans le but de sélectionner spécifiquement le genre *Spirulina* et permettre son développement.

1. 3. 2. Enrichissement :

1. 3. 2. 1. Echantillons des sources thermales de Guelma :

- **Technique par sélection aux antibiotiques :**

Les résultats de l'enrichissement des échantillons des sources thermales de Guelma selon la technique par sélection aux antibiotiques, sont présentés dans le tableau 18 :

Tableau 18 : isolement par sélection aux antibiotiques

Milieux de culture	Numéros des flacons	Aspects des cultures	Observations microscopiques des cultures
BG11 liquide pH 8	Flacon n° 1	Aspect verdâtre dû au développement des cyanobactéries	Bactéries et <i>Microcystis</i>
	Flacon n° 2	Aspect blanchâtre dû à un développement bactérien	Bactéries
	Flacon n° 3	Aspect blanchâtre dû à un développement bactérien	Bactéries
	Flacon n° 4	Aspect blanchâtre dû à un développement bactérien	Bactéries
	Flacon n° 5	Aspect blanchâtre dû au développement bactérien	Bactéries
BG11 liquide pH 9	Flacon n° 1	Aspect blanchâtre dû au développement bactérien	Bactéries
	Flacon n° 2	Aspect blanchâtre dû à un développement bactérien	Bactéries
	Flacon n° 3	Aspect blanchâtre dû à un développement bactérien	Bactéries
	Flacon n° 4	Aspect blanchâtre dû au développement bactérien	Bactéries et <i>Microcystis</i>
	Flacon n° 5	Aspect blanchâtre dû à un développement bactérien	Bactéries
Milieu " Spir" liquide	Flacon n° 1	Aspect blanchâtre dû à un développement bactérien	Bactérie et quelques champignons
	Flacon n° 2	Aspect blanchâtre dû à un développement bactérien	Bactéries
	Flacon n° 3	Aspect blanchâtre dû à un développement bactérien	Bactéries
	Flacon n° 4	Aspect blanchâtre dû au développement bactérien	Bactéries et <i>Microcystis</i>
	Flacon n° 5	Aspect blanchâtre dû à un développement bactérien	Bactéries
	Flacon n° 1	Aspect verdâtre dû au développement des cyanobactéries	Bactéries et <i>Microcystis</i>

BG11 liquide pH 8.5	Flacon n° 2	Aspect blanchâtre dû à un développement bactérien	<i>Microcystis</i> +bactéries et levures
	Flacon n° 3	Aspect blanchâtre dû à un développement bactérien	Bactérie et quelques champignons
	Flacon n° 4	Aspect blanchâtre dû à un développement bactérien	Bactéries et <i>Microcystis</i>
	Flacon n° 5	Aspect blanchâtre dû à un développement bactérien	Bactéries et <i>Microcystis</i>
Milieu Jourdan liquide pH 8.5	Flacon n° 1	Aspect blanchâtre dû à un développement bactérien	Bactéries
BG11 liquide pH 8	Flacon n° 1	Aspect blanchâtre dû à un développement bactérien	Bactéries et champignons en surface
	Flacon n° 2	Aspect verdâtre dû à un développement des cyanobactéries	Bactéries et <i>Microcystis</i>
	Flacon n° 3	Aspect jaunâtre dû au développement des cyanobactéries	Bactéries et <i>Microcystis</i>
BG11 liquide pH 9	Flacon n° 1	Aspect verdâtre dû à un développement des cyanobactéries	Bactéries et <i>Microcystis</i>
	Flacon n° 2	Limpide	Champignons en surface
BG11 liquide pH 9	Flacon n° 1	Aspect blanchâtre dû à un développement bactérien	Bactéries et <i>Microcystis</i>
	Flacon n° 2	Aspect blanchâtre dû à un développement bactérien	Bactéries et champignons
	Flacon n° 3	Aspect blanchâtre dû à un développement bactérien	Bactéries
	Flacon n° 4	Limpide	Champignons noirs en surface
	Flacon n° 5	Aspect blanchâtre dû à un développement bactérien	Champignons dans le liquide
	Flacon n° 6	Aspect blanchâtre dû à un développement bactérien	Bactéries et champignons
	Flacon n° 7	Limpide	Mycélium blanchâtre dans le liquide

Dans le tableau 19, nous avons présenté les concentrations en antibiotiques pour lesquelles le genre *Microcystis* à résisté :

Tableau 19 : résistance du genre *Microcystis* aux différents antibiotiques.

Milieux de culture	Antibiotiques	Concentrations en mg / 100 ml
BG11 liquide (pH 8)	Penicilline G	34.96
	Chloramphénicol	3.49
BG11 liquide (pH 9)	Penicilline G	4.52
	Chloramphénicol	0.45
Milieu " Spir" liquide	Penicilline G	4.52
	Chloramphénicol	0.45
BG11 liquide (pH 8.5)	Penicilline G	2.17, 4.52, 17.82 et 34.96
	Chloramphénicol	0.27, 0.45, 1.780 et 3.490
BG11 liquide (pH 8)	Penicilline G	51.45
	Chloramphénicol	5.14
BG11 liquide (pH 9)	Penicilline G	51.45
	Chloramphénicol	5.14
BG11 liquide (pH 9)	Amoxicilline	25.72
	Céfazoline	25.72
	Chloramphénicol	5.14
BG11 liquide (pH 9)	Streptomycine	40
	Chloramphénicol	5

• **Discussion :**

Les résultats des enrichissements des échantillons des sources thermales de Guelma selon la technique de sélection aux antibiotiques, montrent la croissance du genre *Microcystis* dans certains flacons. Cependant nous n'avons noté aucun développement de l'espèce *Spirulina subsalsa* sur les différents milieux de culture employés.

La croissance du genre *Microcystis* à été observée dans les milieux de culture avec des concentrations en antibiotiques allant de 2.17 à 51.45 mg / 100 ml la pénicilline G, et de 0.27 à 5.14 mg / 100ml pour le chloramphénicol.

• **Technique par ensemencement sur milieu BG11 après lavage des filaments :**

Les résultats de l'enrichissement des échantillons d'algues des sources thermales de Guelma selon la technique par ensemencement sur milieu BG11 après lavage des filaments, sont présentés dans le tableau 20 :

Tableau 20 : isolement par ensemencement sur milieu BG11 après lavage des filaments.

Milieux de culture	Numéros des flacons	Aspects des cultures	Observations microscopiques des cultures
BG11 liquide pH 9	Flacon n° 1	Aspect blanchâtre dû à un développement des champignons	Champignons en surface
	Flacon n° 2	Aspect verdâtre dû à un développement des cyanobactéries	Bactéries et <i>Microcystis</i>
	Flacon n° 3	Limpide	Mycélium blanchâtre dans le liquide

➤ **Discussion :**

Les résultats obtenus de l'enrichissement selon la technique par ensemencement sur milieu BG11 après lavage des filaments obtenus, sont similaires à ceux observés avec la technique précédente.

La croissance du genre *Microcystis* a été observée dans les milieux de culture avec des concentrations en antibiotiques suivantes : amoxicilline : 25.72 ; céfazoline : 25.72 et chloramphénicol : 5.14 mg/100ml de milieu de culture.

- **Technique par ensemencement sur eau carbonatée de sources thermales de Guelma après lavage des filaments :**

Les résultats de l'enrichissement des échantillons d'algues de sources thermales de Guelma selon la technique par ensemencement sur milieu à base d'eau carbonatée après lavage des filaments, sont présentés dans le tableau 21 :

Tableau 21 : isolement par ensemencement sur eau thermale de Guelma après lavage des filaments

Milieux de culture	Numéros des flacons	Aspects des cultures	Observations microscopiques des cultures
Eau carbonatée de Guelma	Flacon n° 1	Limpide	Mycélium blanchâtre dans le liquide
	Flacon n° 2	Aspect blanchâtre dû à un développement des champignons	Bactéries et champignons

➤ **Discussion :**

Les résultats de l'enrichissement selon la technique par ensemencement sur milieu à base carbonatée de sources thermales de Guelma après lavage des filaments obtenus, sont similaires à ceux obtenus avec la technique précédente, en revanche nous avons remarqué l'absence de croissance du genre *Microcystis* de même que pour l'espèce *Spirulina subsalsa*.

- **Isolement sélectif aux antibiotiques :**

Les résultats de l'enrichissement des échantillons des sources thermales de Guelma selon la technique d'isolement aux antibiotiques avec séries de dilutions, sont présentés dans le tableau 22 :

Tableau 22 : isolement aux antibiotiques avec séries de dilutions

Milieux de culture	Numéros des tubes	Observations microscopiques des cultures
BG11 liquide pH 9	1 à 6	Absence de croissance de <i>Spirulina subsalsa</i> Présence de colonie de <i>Microcystis</i> Présence de mycéliums blanchâtres en surface
	1 à 6	Idem
	1 à 6	Idem

➤ **Discussion :**

Les résultats de l'enrichissement selon la technique d'isolement aux antibiotiques avec séries de dilutions, sont similaires à ceux obtenus avec les techniques précédentes : absence de développement de *Spirulina subsalsa*.

- **Technique par ensemencement sur milieu alcalin et milieux à base d'eau de mer :**

Les résultats de l'enrichissement des échantillons d'algues des sources thermales de Guelma selon la technique par ensemencement sur milieu alcalin et milieux à base d'eau de mer, sont présentés dans le tableau 23 :

Tableau 23 : isolement par ensemencement sur milieu alcalin et milieux à base d'eau de mer

Milieux de culture	Numéros des flacons	Aspects des cultures	Observations microscopiques des cultures
Milieu MN	Flacon n° 1 et 3	Aspect verdâtre dû à un développement bactérien	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Dégénérescence des filaments de <i>Spirulina subsalsa</i> ▪ Développement très dense des bactéries photosynthétiques.
	Flacon n° 2, 4 et 5	Aspect verdâtre dû à un développement bactérien	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Filaments de <i>Spirulina subsalsa</i> devenus très fins et moins verts ▪ Présence de colonie de <i>Microcystis</i> ▪ Croissance sur les parois de bactéries photosynthétiques
Milieu à base d'eau de mer enrichie en : FeSO₄, NaNO₃, K₂HPO₄	Flacon n° 1, 2, 3, 4, et 5	Aspect verdâtre dû à un développement bactérien	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Mort et dégénérescence des filaments de <i>Spirulina subsalsa</i> ▪ Développement léger de bactéries photosynthétiques ▪ Formation de spores de champignons
Milieu à base d'eau de mer enrichie en : FeSO₄, Urée, K₂HPO₄	Flacon n° 1, 2, 3, 4, et 5	Limpides	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Absence complète des filaments verts ▪ Croissance de champignons
Eau carbonatée de Guelma pH 9	Flacon n° 1, 2, 3, et 4	Aspect verdâtre du à un développement bactérien	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Dégénérescence des filaments de <i>Spirulina susalsa</i> ▪ Formation de spores de champignons et croissance légère de bactéries photosynthétiques

➤ **Discussion :**

Les résultats de l'enrichissement des échantillons des eaux thermales de Guelma selon la technique d'isolement par ensemencement sur milieu alcalin et milieux à base d'eau de mer (tableau 23), nous montrent un développement très dense de bactéries, de champignons et de levures dans la plupart des flacons.

Nous avons observé une dégénérescence et une mort des filaments verts du genre *Spirulina*, et ce malgré l'utilisation de milieux de culture spécifiques pour le genre *Spirulina*. En revanche la croissance du genre *Microcystis* a été observée dans certains flacons.

1. 3. 2. 2. Echantillons des sources chaudes de la région de Constantine :

Les résultats de l'enrichissement des échantillons des sources thermales de Constantine, sont présentés dans le tableau 24 :

Tableau 24 : résultats de l'enrichissement des échantillons d'eau.

Milieux de culture	Numéros des flacons	Aspects des cultures	Observations microscopiques des cultures
BG11 liquide pH 7	Flacon n° 1	Limpide	Absence de culture
BG11 liquide pH 10	Flacon n° 2	Limpide	Absence de culture

➤ Discussion :

D'après les résultats de l'enrichissement de l'échantillon d'eau prélevé à partir de sources thermales de la région de Constantine, nous avons noté l'absence de développement de formes de cyanobactéries, malgré la nature carbonatée de cette eau (concentration en bicarbonate : 200 mg/l), et sa température (T=28 °C et pH 7.7).

1. 3. 3. Conclusion :

Les résultats des observations microscopiques des échantillons des eaux thermales, ont révélé la présence du *Spirulina subsalsa* mélangée avec d'autres cyanobactéries filamenteuses dans l'ensemble des échantillons d'eau de surface prélevés à partir des sources thermales de la région de Guelma.

Les différentes techniques et les méthodes d'enrichissement réalisées sur des milieux de culture spécifiques (milieu BG11 à différents pH, milieux alcalin et milieux à base d'eau de mer), en utilisant chaque fois plusieurs solutions d'antibiotiques avec des concentrations, n'ont pas permis la croissance de l'espèce *Spirulina subsalsa*.

Ces résultats montrent bien que l'obtention des cultures axéniques à partir des échantillons récoltés dans la nature; reste une étape très difficile à réaliser.

2. Culture de *Arthrospira* sp. PCC8005 :

2. 1. Objectifs du travail :

Dans le cadre de notre étude, nous avons réalisé la culture de la souche *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur différents milieux (milieux classiques et milieux composés d'eaux carbonatées de sources thermales de Guelma et de Constantine). Le but étant :

- Etudier la croissance de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur les deux types de milieux de culture mentionnés précédemment.
- Extraire et doser les différents pigments photosynthétiques notamment la phycocyanine et la chlorophylle "a".
- Caractériser les autres pigments photosynthétiques.

2. 2. Examen microscopique :

Les résultats de l'observation microscopique de l'inoculum de la souche *Arthrospira* sp. PCC8005, sont présentés dans le tableau 25 et la figure 2 (photo D : coloration avec lugol) :

Tableau 25 : caractères morphologiques de *Arthrospira* sp. PCC 8005.

Souche	Ordre	Caractères morphologiques
<i>Arthrospira</i> sp. PCC 8005	Oscillatoriales	Trichome : en spires très ouvertes Couleur : vert Diamètre : 4 µm Longueur : 115µm Parois intercellulaires : visibles, granulés Akinètes : absents Hétérocystes : absents

D'après les résultats du tableau 22, nous avons constaté que nos observations se rapprochent de celles rapportés par Iltis (1970), Compère (1974), Fox (1999) et Castenholz (2001), dans leurs études sur la morphologie de *Arthrospira*.

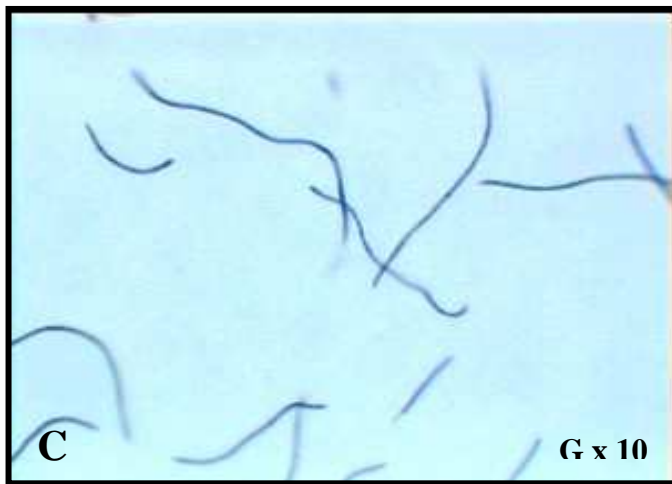


Figure 4 : morphologie de *Arthrospira* sp. PCC 8005 (A, B, C et D).

2. 3. Etude de la croissance de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur les milieux de culture classiques :

2. 3. 1. Croissance de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur le milieu BG11 :

Les résultats de la culture de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur le milieu BG11 pour une période d'incubation de 27 jours et sous lumière continue, sont représentés dans la photo 7 et le graphe 1 :

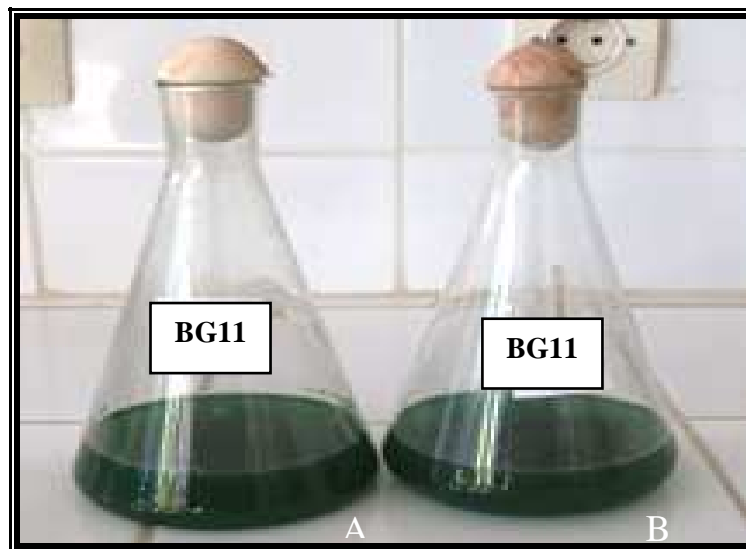
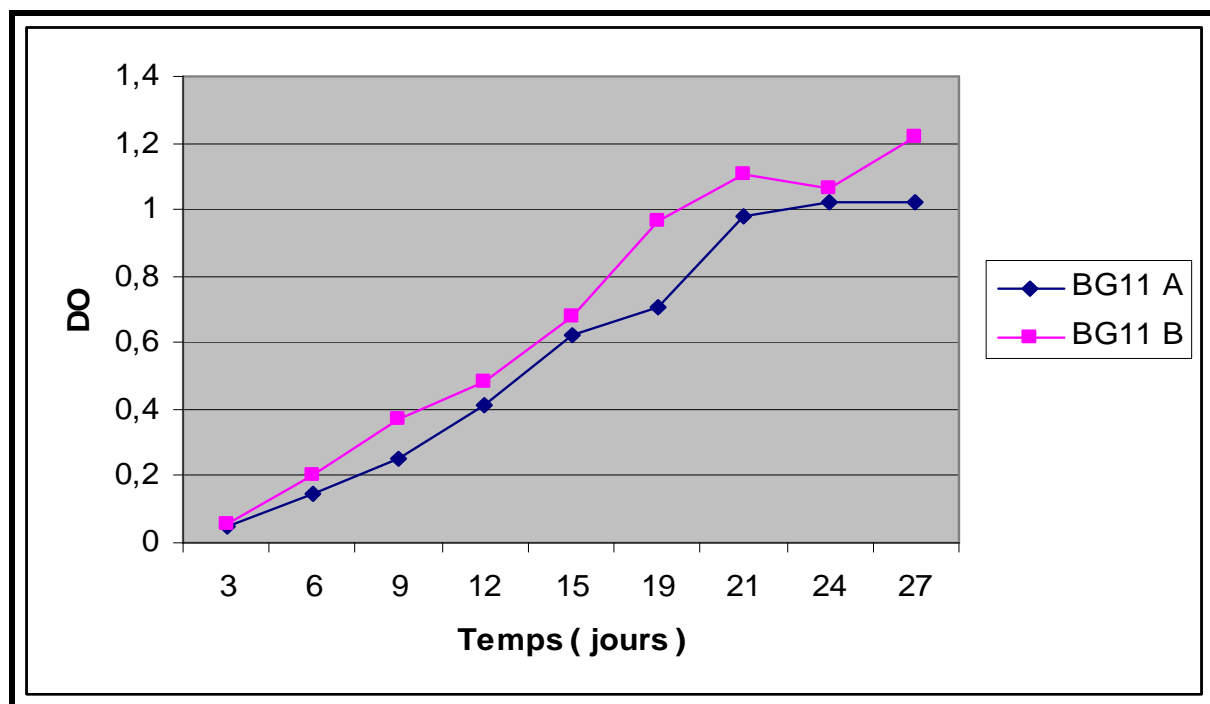


Photo 7 : culture de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur le milieu BG11 (pH 9.5)

On observe à l'oeil nu (photo 7), que la culture de la souche *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur le milieu BG11 est de couleur vert foncé, avec un développement très dense. Ceci est dû essentiellement au pH alcalin du milieu.



Graphe 1 : croissance de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur le milieu BG11

L'Examen du graphe 1, nous montre que les deux courbes de croissance de la souche *Arthrospira* sp. PCC 8005 sont similaires dans les deux flacons A et B.

On observe une croissance continue dans l'intervalle de temps allant de 3 à 21 jours d'incubation, au delà de 21 jours, la croissance ralentit dans les deux flacons.

Le ralentissement de la croissance est expliqué par la diminution ou l'épuisement de la concentration de la source du carbone (NaHCO_3) dans le milieu BG11.

2. 3. 2. Croissance de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur le milieu "Spir" :

Les résultats de la culture de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur le milieu "Spir" pour une période d'incubation de 27 jours et sous lumière continue, sont représentés dans la photo 8 et le graphe 2 :

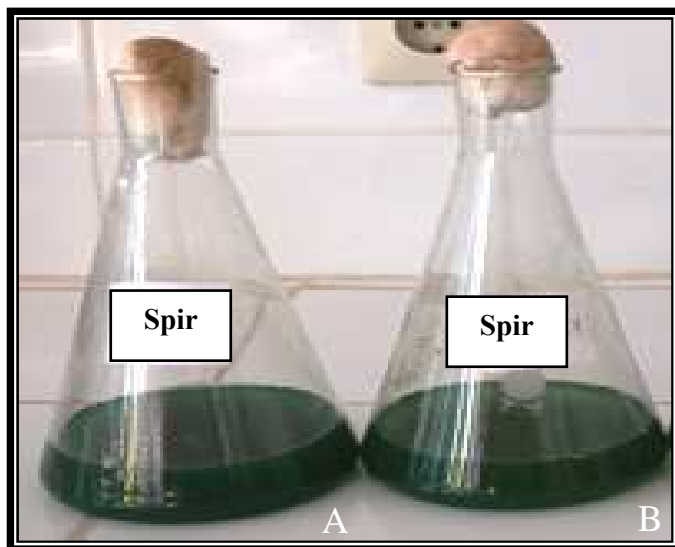
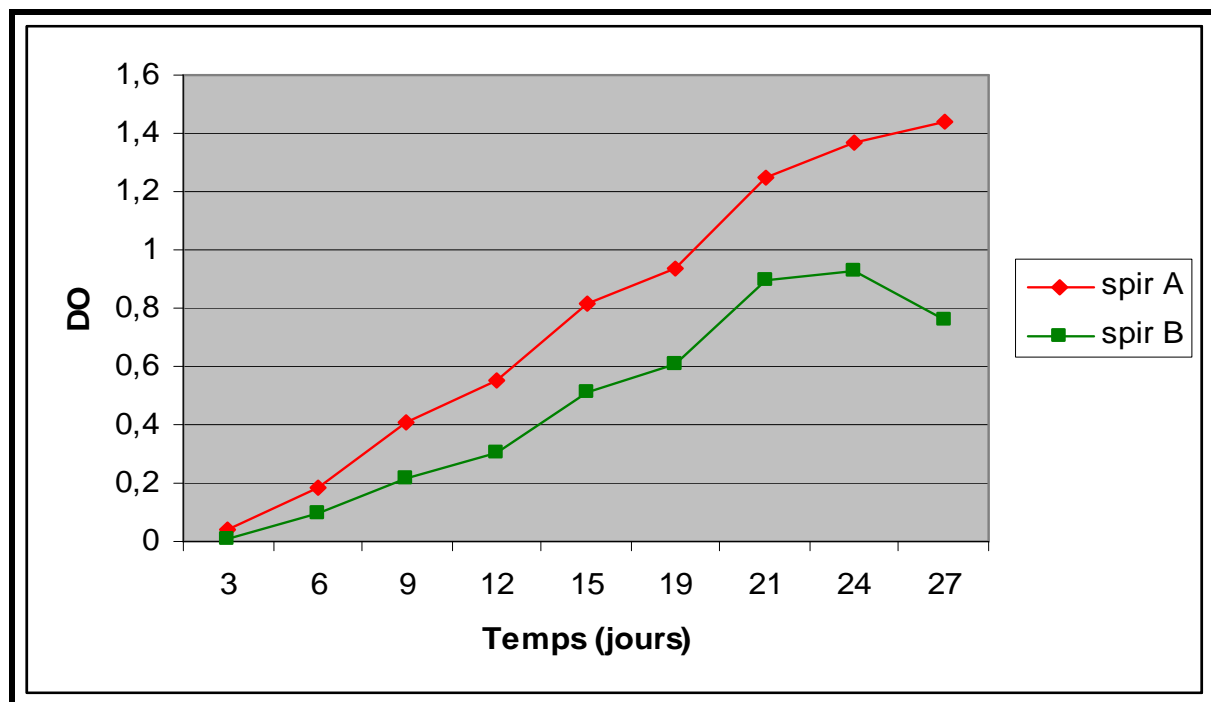


Photo 8 : culture de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur le milieu "Spir"

La photo 8, montre que la culture de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur le milieu "Spir", est de couleur vert foncé, caractérisée par un développement massif dans les deux flacons A et B.



Graphe 2 : croissance de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur le milieu "Spir"

Les résultats du graphe 2, montrent que les deux courbes de croissance de *Arthrospira* sp. PCC8005 dans les deux flacons (A et B) du milieu "Spir " sont différentes.

Dans le flacon A, la croissance est continue durant toute la période d'incubation (27 jours), en revanche, nous avons remarqué que la croissance diminue au bout de 21 jours d'incubation dans le flacon B.

2. 3. 3. Croissance de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur le milieu Zarrouk :

Les résultats de la culture de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur le milieu Zarrouk pour une période d'incubation de 27 jours et sous lumière continue, sont représentés dans la photo 9 et le graphe 3 :

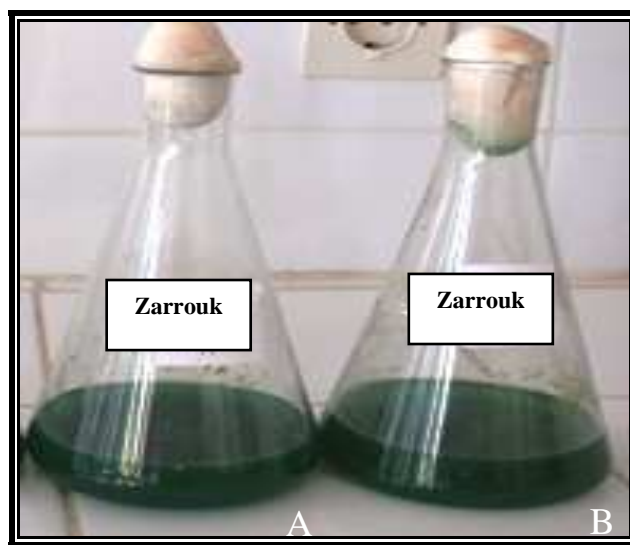
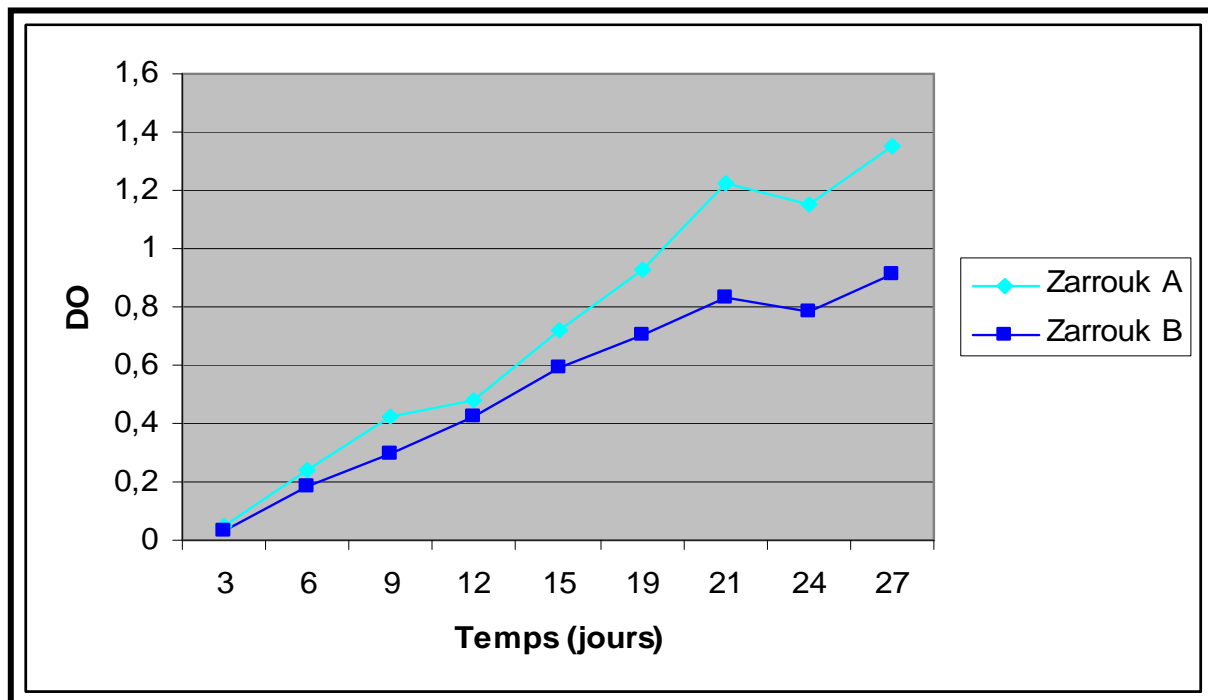


Photo 9 : culture de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur le milieu Zarrouk (pH 9.5)

On observe à l'oeil nu, que le développement de la souche *Arthrospira* sp. PCC8005 sur le milieu Zarrouk est très dense, d'une couleur vert foncé.



Graph 3 : croissance de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur le milieu Zarrouk

Il ressort du graph 3, que l'allure des deux courbes de croissance de *Arthrospira* sp. PCC8005 sur le milieu Zarrouk, sont similaires dans les deux flacons A et B.

Cependant nous avons noté que la biomasse obtenue dans le flacon A pour une période d'incubation de 27 jours, est nettement supérieure à celle observée dans le flacon B du milieu Zarrouk.

2. 3. 4. Discussion :

Les résultats de l'étude de la croissance de la souche *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur les différents milieux de culture classiques, montrent que la croissance de la souche sur les milieux BG11, "Spir" et Zarrouk est pratiquement similaire. Ceci est dû essentiellement au pH alcalin commun entre ces différents milieux, ainsi que les concentrations en carbonates et en nitrates (NO_3).

2. 4. Etude de la croissance de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur eaux carbonatée de sources thermales :

2. 4. 1. Croissance de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur milieu à base d'eau thermale de Guelma :

Les résultats de la culture de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur le milieu à base d'eau carbonatée de sources thermales de Guelma pour une période d'incubation de 27 jours et sous lumière continue, sont représentés dans la photo 10 (G_n : eau carbonatée de sources thermales de Guelma, G_p : eau carbonatée de sources thermales de Guelma à pH 9.5) et les graphes 4 et 5 :

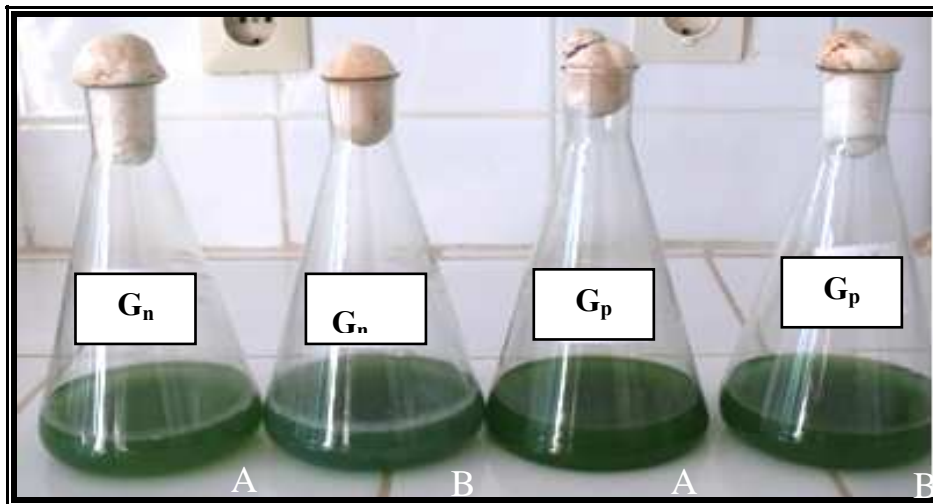
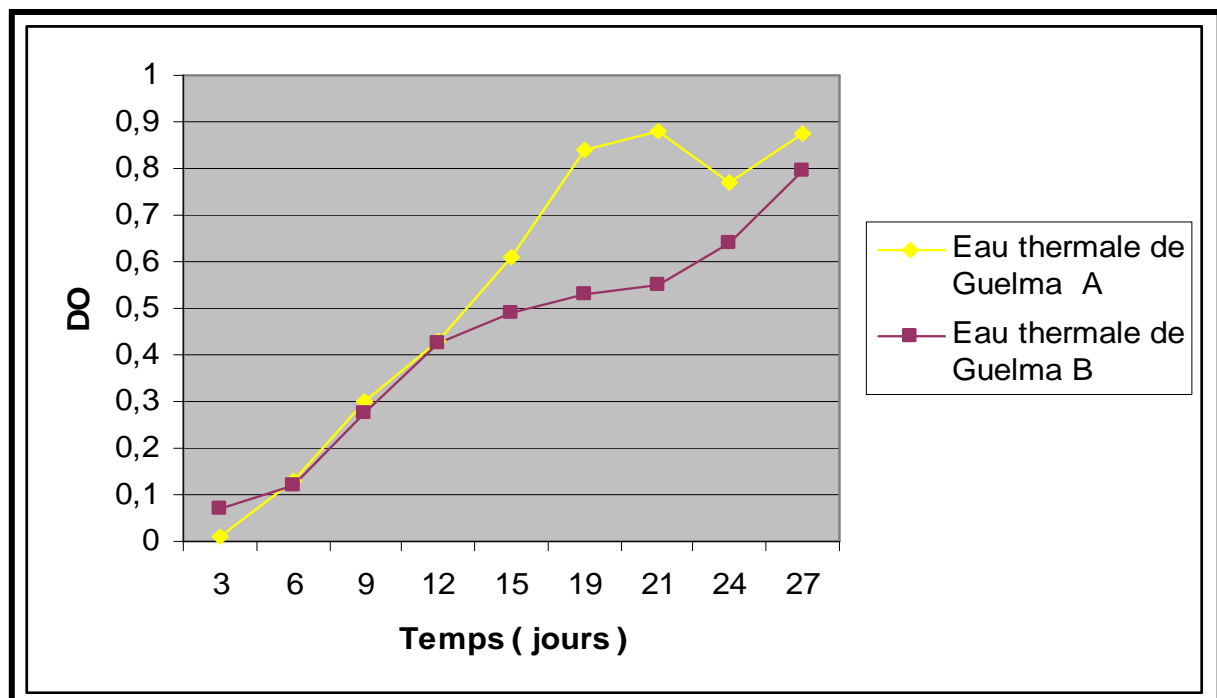


Photo 10 : culture de *Arthrospira* sp. PCC8005 sur milieu à base d'eau carbonatée de sources thermales de Guelma.

D'après la photo 9, nous remarquons que la croissance de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur le milieu à base d'eau carbonatée de Guelma (pH 9.5), est plus importante (développement très dense) comparée à celle du milieu à base d'eau carbonatée naturelle de Guelma. Ceci est probablement dû au pH alcalin.

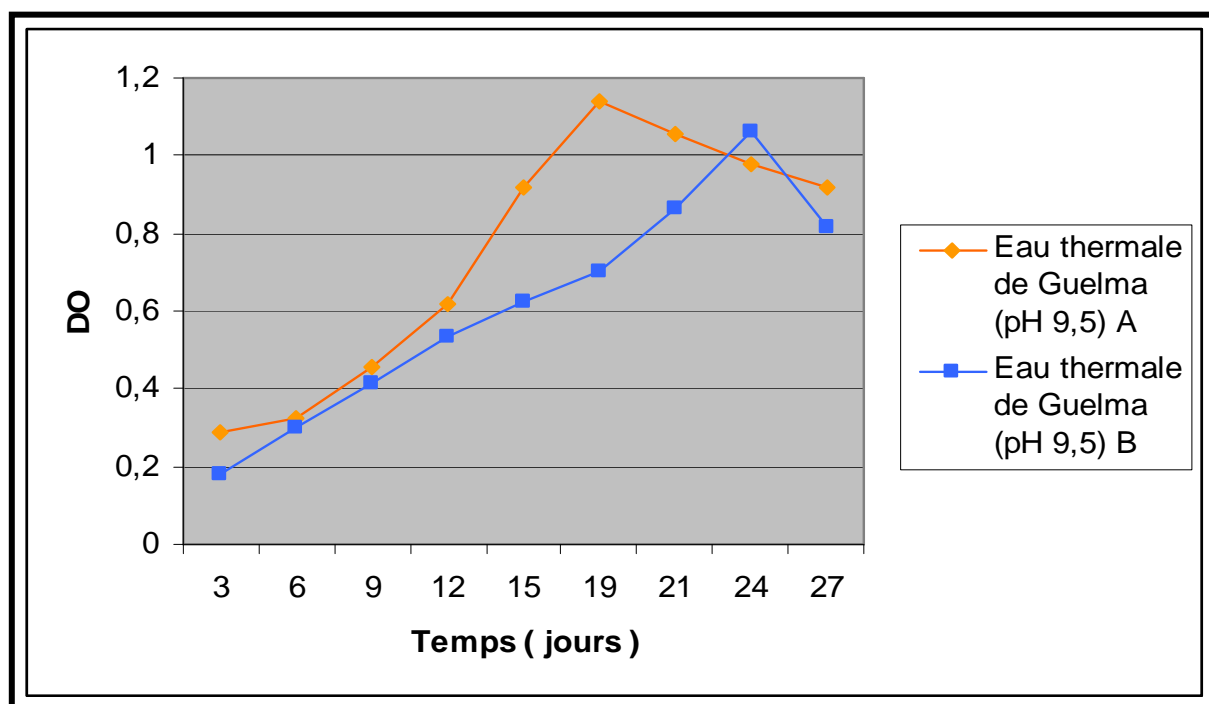


Graphe 4 : croissance de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur milieu à base d'eau carbonatée de sources thermales de Guelma.

D'après les résultats du graphe 4, nous remarquons que les deux courbes de croissance de *Arthrospira* sp. PCC 8005 dans les deux flacons A et B, sont similaires pour une période d'incubation de 3 à 12 jours. Au delà de 12 jours, la croissance de la souche dans le flacon A, s'accélère jusqu'à 19 jours, puis ralentit au bout de 24 jours d'incubation.

Cependant une période de ralentissement de croissance est observée dans le flacon B entre 12 et 21 jours d'incubation, au delà la croissance s'accélère.

Il est à noter que la biomasse finale (au bout de 27 jours d'incubation), est pratiquement la même dans les deux flacons A et B.



Graphe 5 : croissance de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur milieu à base d'eau carbonatée (pH 9.5) de sources thermales de Guelma

A partir du graphe 5, nous remarquons que les deux courbes de croissance de *Arthrospira* sp. PCC8005 dans les deux flacons A et B, sont similaires pour une période de 3 à 12 jours d'incubation. Au-delà, une période d'accélération de croissance est observée dans les deux flacons ; et cette phase est plus importante dans le flacon A que dans le flacon B.

La croissance de la souche diminue dans le milieu à base d'eau carbonatée de Guelma (pH 9.5), au bout de 19 et 24 jours dans les deux flacons A et B respectivement.

- **Discussion :**

D'après les résultats obtenus, nous concluons que la croissance de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur le milieu à base d'eau carbonatée (pH 9.5) de sources thermales de Guelma est relativement plus importante que dans l'eau carbonatée naturelle. Ceci est dû principalement à la différence dans la valeur du pH entre ces deux milieux.

Ces résultats sont comparables à d'autres études qui ont été effectuées par : Fox, 1999 ; Carvalho *et al.*, (2002), Vonshak *et al.*, (1982) et Jourdan (2006). Ces études ont permis de montrer que la croissance optimale de *Arthrospira* est obtenue à un pH de 9.5.

2. 4. 2. Croissance de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur milieu à base d'eau thermale de Constantine :

Les résultats de la culture de *Arthrospira* sp. PCC8005 sur le milieu à base d'eau thermale de Constantine pour une période d'incubation de 27 jours sous lumière continue, sont représentés dans la photo 10 (G_n : eau carbonatée de sources thermales de Constantine, G_p : eau carbonatée de sources thermales de Constantine à pH 9.5) et les graphes n^{os} 6 et 7 :

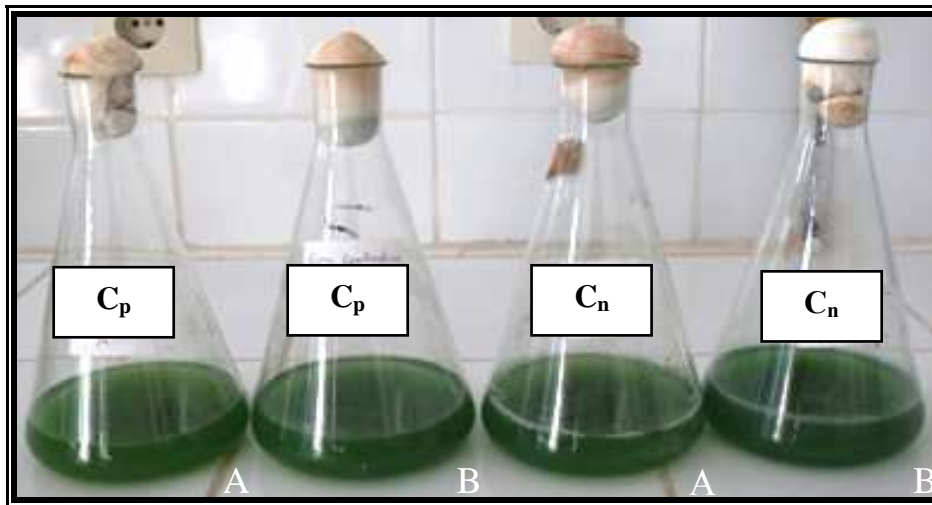
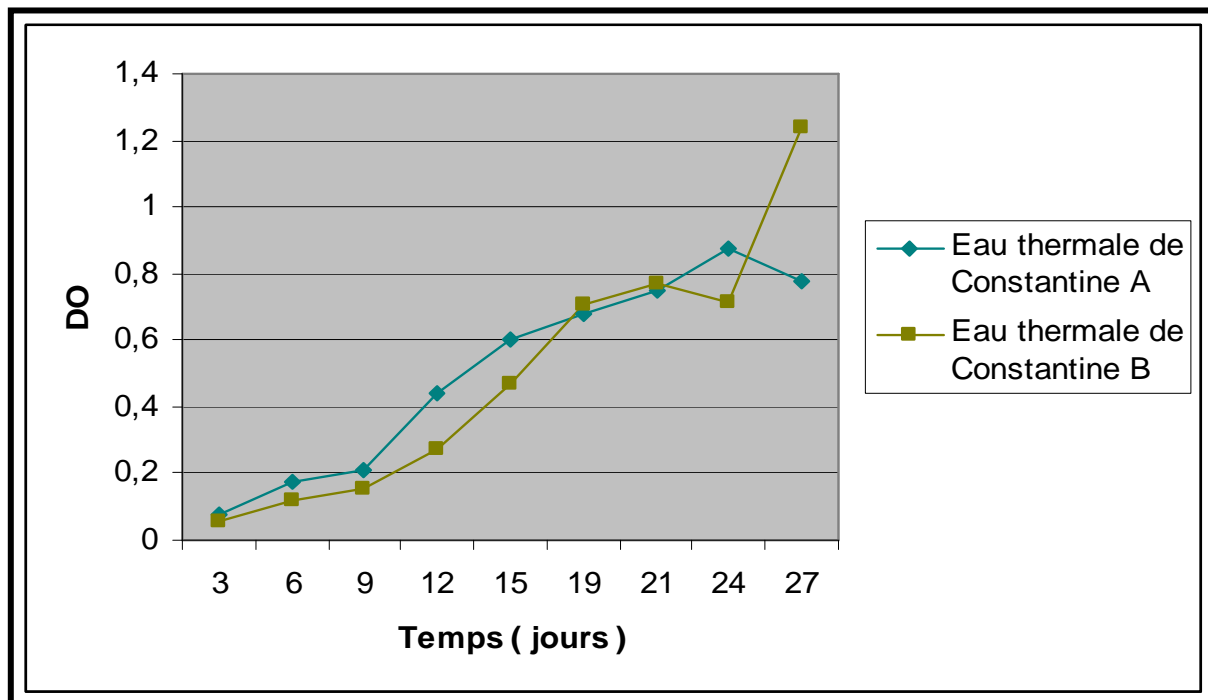


Photo 10 : culture de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur le milieu à base d'eau carbonatée de sources thermales de Constantine

D'après la photo 10, on observe à l'œil nu que la croissance de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur l'eau carbonatée (pH 9.5) de sources thermales de Constantine est comparable à celle de l'eau carbonatée naturelle ; caractérisée par un développement massif, de couleur vert foncé dans les deux milieux.

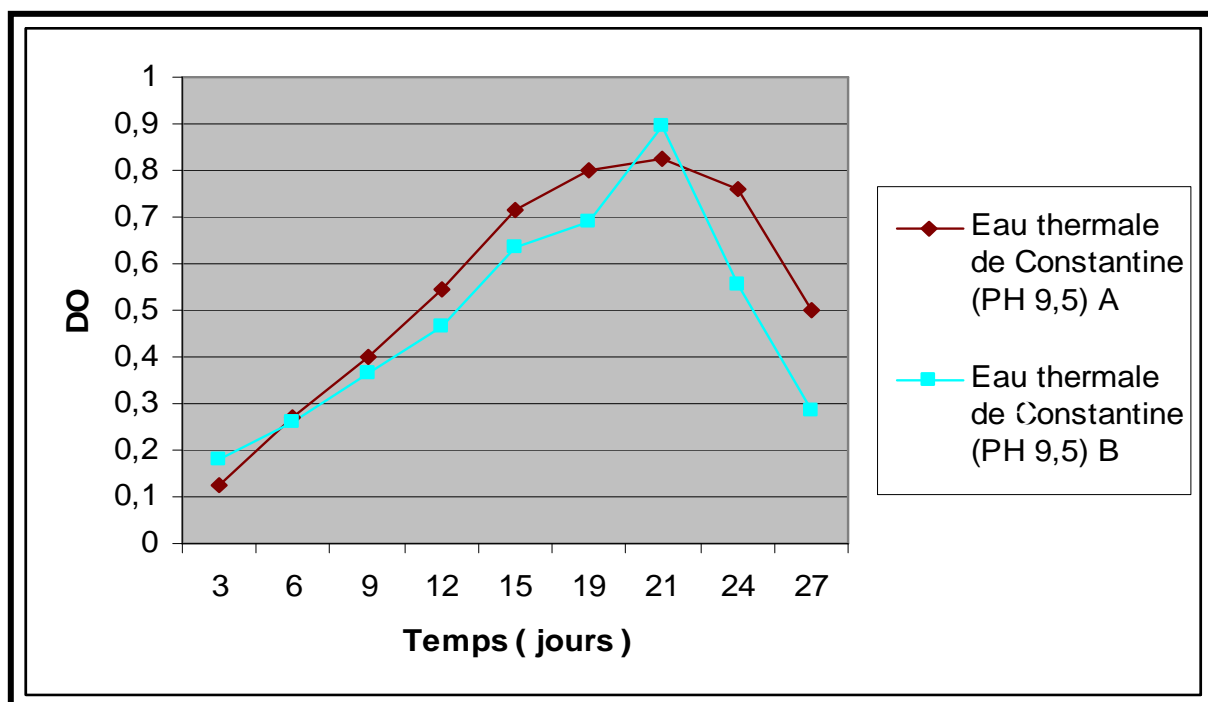
Dans le cas de l'eau carbonatée de Constantine, l'augmentation du pH n'a pas amélioré la croissance de la souche *Arthrospira* sp. PCC 8005.



Graphe 6 : croissance de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur le milieu à base d'eau carbonatée de sources thermales de Constantine.

D'après les résultats du graphe 6, nous remarquons que les deux courbes de croissance sont similaires dans les flacons (A et B) contenant le milieu à base d'eau carbonatée des sources thermales de Constantine, durant toute la période d'incubation (27 jours).

On observe une croissance continue entre une période de 3 à 24 jours d'incubation, au delà la croissance ralentit dans les deux flacons A et B.



Graphe 7 : croissance de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur milieu à base d'eau carbonatée (pH 9.5) de sources thermales de Constantine.

D'après le graphe 7, nous remarquons que les deux courbes de croissance de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur le milieu à base d'eau carbonatée (pH 9.5) de sources thermales de Constantine (flacons A et B), sont similaires pour une période de 27 jours d'incubation.

Nous avons noté que l'optimum de la croissance de *Arthrospira* sp. PCC 80005 sur le milieu à base d'eau carbonatée de Constantine (pH 9.5), est observé au bout de 21 jours d'incubation dans les deux flacons A et B, suivi d'une diminution de croissance .

- **Discussion :**

La croissance de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur les deux milieux à base d'eau carbonatée de sources thermales de Constantine (naturelle et pH 9.5), est pratiquement identique.

Lorsque nous avons augmenté le pH de l'eau carbonatée de Constantine, nous n'avons pas remarqué une amélioration notable de la croissance.

En plus, pour le milieu à base d'eau carbonatée (pH 9.5), nous remarquons une phase de dégénérescence au delà d'une période de 21 jours d'incubation ; ce qui n'a pas été observé dans le cas de l'eau carbonatée naturelle.

2. 5. Etude comparative entre les biomasses obtenues dans les sept milieux de culture :

Les moyennes de la DO de *Arthrospira* sp. PCC8005 obtenues après une période de 19 jours d'incubation, sont présentées dans le tableau 26 :

Tableau 26 : biomasses obtenues après 19 jours d'incubation

Milieux de culture	Moyenne de la DO à 19 jours d'incubation
Milieu à base d'eau carbonatée (pH 9.5) de Guelma	0.92
Milieu BG11 (pH 9.5)	0.83
Milieu Zarrouk (pH 9.5)	0.81
Milieu "Spir" (8.7)	0.77
Milieu à base d'eau carbonatée (pH 9.5) de Constantine	0.74
Milieu à base d'eau carbonatée de Guelma	0.68
Milieu à base d'eau carbonatée de Constantine	0.69

La culture de *Arthrospira* sp. PCC 8005 dans les milieux avec pH 9.5 donnent des biomasses généralement supérieures à celles obtenues avec des pH voisins de la neutralité (de 6.37 à 7.7).

La comparaison entre les milieux à base d'eaux carbonatées, montre que le milieu à base d'eau carbonatée (pH 9.5) de sources thermales de Guelma, donne une biomasse nettement supérieure à celle

obtenue avec le milieu à base d'eau carbonatée (pH 9.5) de source thermale de Constantine. Cependant les deux milieux à base d'eau carbonatée naturelle de sources thermales de Guelma et de Constantine donnent des biomasses comparables.

2. 6. Conclusion :

D'après les résultats de l'étude de la croissance de la souche *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur les différents milieux de culture classiques et les milieux à base d'eaux thermales carbonatées, nous concluons que :

La croissance de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur différents les milieux de culture testés est linéaire ; ceci est probablement dû à la lumière artificielle continue utilisée dans notre étude, et qui semble être le facteur limitant.

L'augmentation du pH des différents milieux de culture employés dans cette étude, a amélioré et influencé la croissance de *Arthrospira* sp. PCC 8005. En effet l'alcalinité du milieu de culture est un facteur très important et même limitant pour une croissance optimale du genre *Arthrospira* (Fox, 1999 ; Ciferri, 1983, Congming *et al.*, 1999 ; Alam *et al.*, 2005).

Les concentrations en biomasse obtenues dans notre étude, paraissent faibles. Probablement si nous avons utilisé un système d'agitation performant ; on aurait eu beaucoup plus de biomasses finales.

La croissance de *Arthrospira* sp. PCC8005 sur les milieux à base d'eaux carbonatées des sources thermales de Guelma et de Constantine (pH alcalin), est très intéressante.

Les concentrations en biomasses obtenues avec les milieux à base d'eaux carbonatées (Guelma et Constantine), sont comparables et même supérieures à celles obtenues avec certains milieux classiques.

3. Composition de *Arthrospira* sp. PCC 8005 en divers pigments :

3. 1. La chlorophylle "a" :

Les biomasses obtenues à partir de différents milieux de culture testés, ont été utilisées pour l'extraction et le dosage de la chlorophylle "a".

Les résultats du dosage de la chlorophylle "a", sont représentés dans le tableau 27 :

Tableau 27 : résultats du dosage de la chlorophylle "a".

Milieux de culture	DO à $\lambda=663\text{nm}$	DO à $\lambda=645\text{nm}$	DO à $\lambda=630\text{nm}$	DO à $\lambda=750\text{nm}$
BG11	1,250	0,481	0,346	0
"Spir"	0,991	0,295	0,235	0
Zarrouk	0,677	0,170	0,114	0
Eau carbonatée de Constantine	0,930	0,189	0,162	0
Eau carbonatée de Constantine (pH 9,5)	0,910	0,212	0,158	0
Eau carbonatée de Guelma	0,852	0,202	0,163	0
Eau carbonatée de Guelma (pH 9,5)	1,321	0,427	0,323	0

Nous avons présenté les différentes concentrations de la chlorophylle "a" extraite à partir de différentes biomasses, dans l'histogramme de la figure 5 :

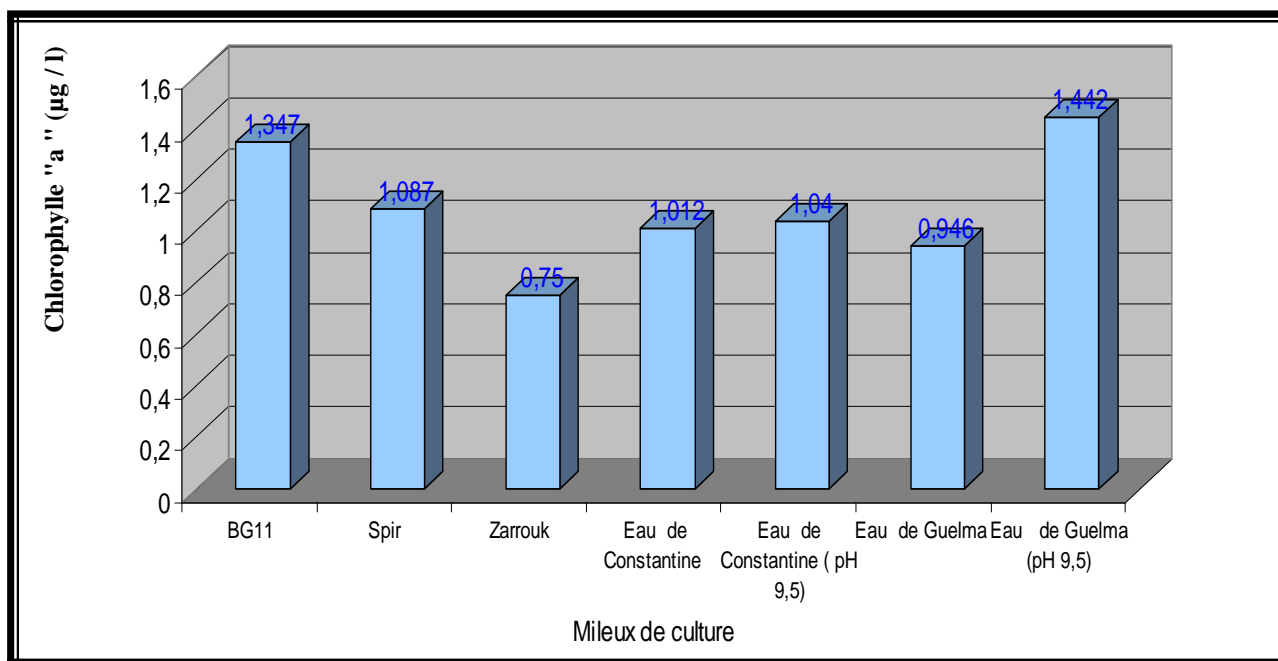


Figure 5 : concentrations en chlorophylle "a" selon le milieu de culture utilisé.

- **Discussion :**

La figure 5, nous montrent que les concentrations les plus élevées en chlorophylle "a", sont observées dans les biomasses obtenues avec les deux milieux de culture : eau carbonatée (pH 9.5) de Guelma et le milieu BG11. Ceci est peut être relié à la quantité de biomasses élevées obtenues avec ces même milieux.

La concentration de la chlorophylle "a", est fonction de la concentration en biomasse dans chaque milieu de culture.

Ce constat va dans le même sens de l'étude de Lamela *et al.*, (2000), où ils ont montrés que le taux de croissance est en relation directe avec la quantité de la chlorophylle produite.

3. 2. La phycocyanine :

Les résultats de l'extraction et l'estimation de la pureté de phycocyanine à partir de chaque culture de *Arthrospira* sp. PCC 8005, sont présentés dans le tableau 28 et photo 12 et 13 :

Tableau 28 : estimation de la concentration et du taux de pureté de la phycocyanine selon le milieu de culture utilisé

Milieus de culture	DO à $\lambda=280$	DO à $\lambda=562$	DO à $\lambda=615$	DO à $\lambda=620$	DO à $\lambda=630$	DO à $\lambda=652$	Phycocyanine (mg/g)	Taux de pureté
"Spir"	0,699	0,971	1,449	1,481	1,422	0,831	0.26	2.11
BG11	1,243	2,121	1,784	1,795	1,772	1,497	0.32	1.44
Zarrouk	1,452	0,757	0,702	0,726	0,723	0,622	0.12	0.5
Eau carbonatée de Guelma	0,985	1,364	1,654	1,667	1,634	1,169	0.29	1.69
Eau carbonatée de Guelma (pH 9.5)	0,709	0,6	0,938	0,971	0,92	0,583	0.17	1.36
Eau carbonatée de Constantine	0,42	0,267	0,377	0,398	0,377	0,24	0.06	0.94
Eau carbonatée de Constantine (pH9.5)	0,358	0,195	0,297	0,3	0,284	0,19	0.05	0.83

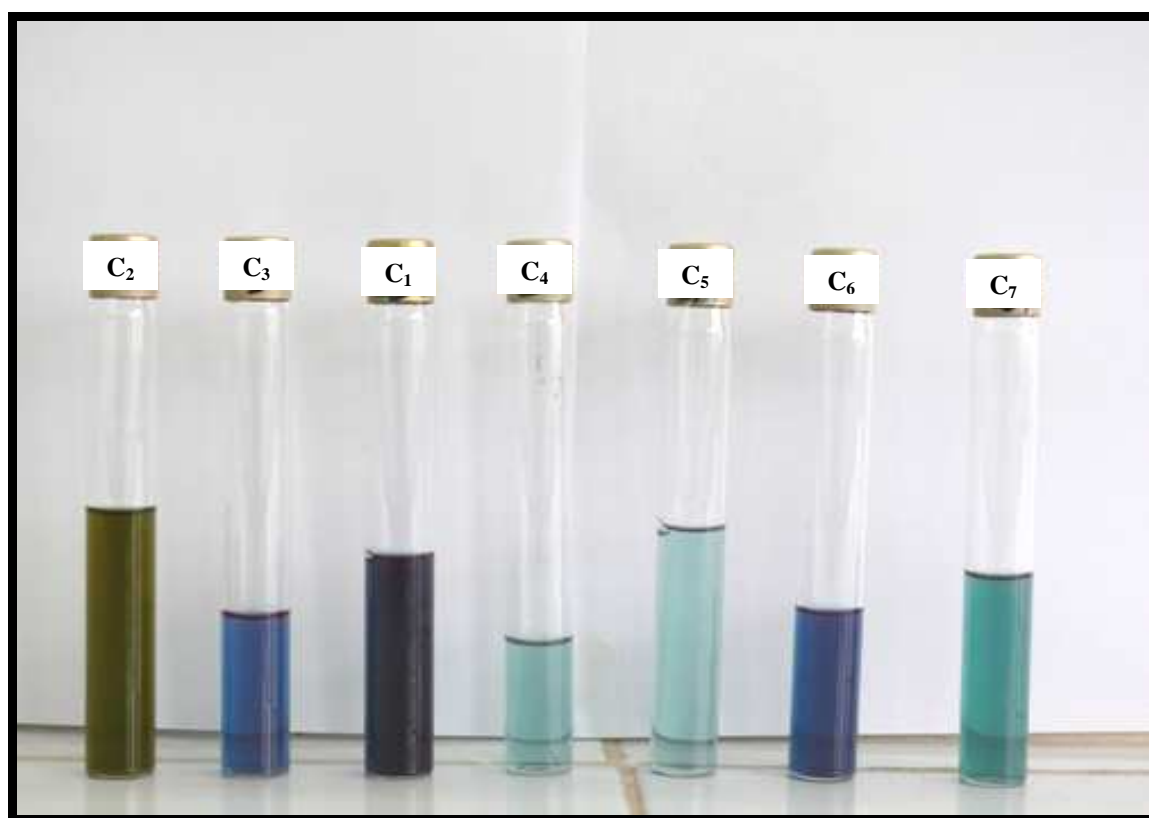


Photo 12 : extraits de phycocyanine selon le milieu de culture utilisé

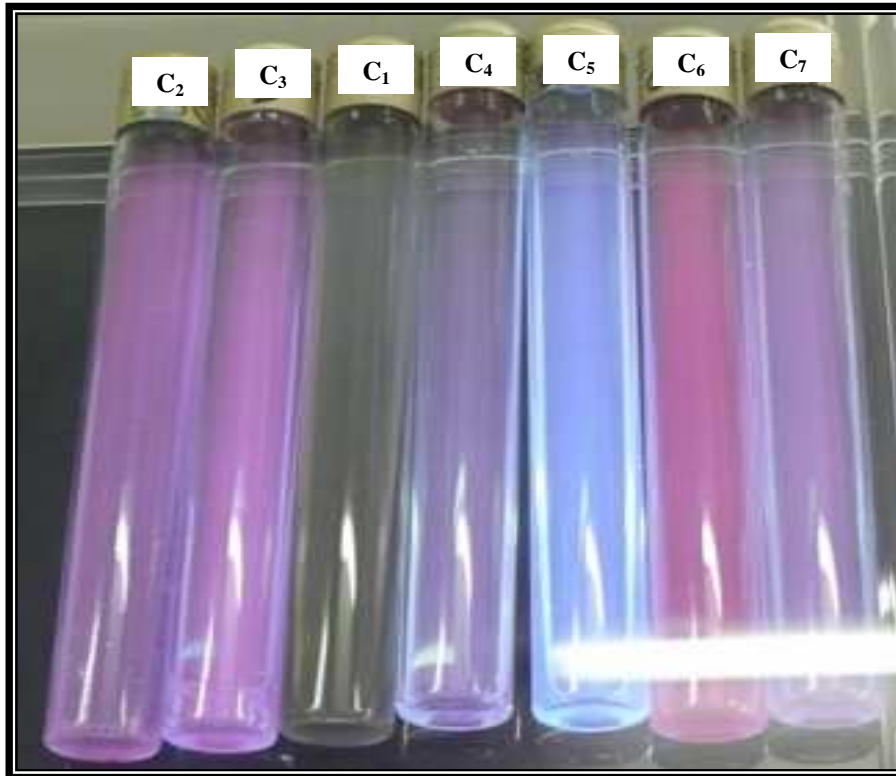


Photo 13 : visualisation des extraits de phycocyanine sous lumière ultra-violette.

- C₁ : Phycocyanine extraite à partir de culture de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur milieu BG11.
- C₂ : Phycocyanine extraite à partir de culture de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur milieu Zarrouk.
- C₃ : Phycocyanine extraite à partir de culture de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur milieu "Spir".
- C₄ : Phycocyanine extraite à partir de culture de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur milieu à base d'eau thermale naturelle de la région de Constantine.
- C₅ : Phycocyanine extraite à partir de culture de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur milieu à base d'eau thermale (pH 9.5) de la région de Constantine.
- C₆ : Phycocyanine extraite à partir de culture dans de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur milieu à base d'eau thermale naturelle de la région de Guelma.
- C₇ : Phycocyanine extraite à partir de culture de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur milieu à base d'eau thermale (pH 9.5) de la région Guelma.

- **Discussion :**

La phycocyanine présente environ 30% de la biomasse, mais sa concentration dans les cellules dépend des conditions de croissance (Lamela *et al.*, 2000).

D'après les résultats du tableau 28, nous remarquons que la concentration en phycocyanine dans les milieux classiques (BG11 et «Spir», est supérieure à celle obtenue avec les milieux à base d'eaux carbonatées de Guelma et de Constantine.

La concentration en phycocyanine dans le milieu "Spir" est 4 fois supérieure à celle obtenue dans le milieu à base d'eau carbonatée de Constantine ; et 2 fois supérieure à celle obtenue dans le milieu à base d'eau carbonatée (pH 9.5) de Guelma .

Ces résultats confirment que la concentration de la phycocyanine est influencée par la composition du milieu de culture (Lamela *et al.*, 2000).

Cette différence est expliquée par la concentration en NaNO_3 dans ces milieux de culture, c'est-à-dire que plus la concentration du NaNO_3 est élevée, plus on a d'accumulation de phycocyanine (qui est une protéine).

Pour l'eau carbonatée des sources thermales de Guelma, même si la concentration en phycocyanine est faible ; nous avons obtenu un taux de pureté élevé de 1.69.

Les résultats des taux de pureté de la phycocyanine obtenues avec les deux milieux "Spir" et milieu à base d'eau carbonatée (pH 9.5) de Guelma, sont très intéressants car ils diffèrent de ceux obtenus dans les études de Yi-Ming *et al.*, (1999) et Minkova *et al.*, (2003), où ils ont obtenus des taux de pureté de 0.95 et 1.8 respectivement , et qui sont très inférieurs à ceux obtenus dans notre étude.

3. 3. Mise en évidence et caractérisation d'autres pigments :

L'extraction et la séparation des autres pigments photosynthétiques présentes dans chaque culture de la souche *Arthrospira* sp. PCC 8005 ont révélé la présence de deux classes de pigments photosynthétiques : chlorophylle et xanthophylle (figure 6).

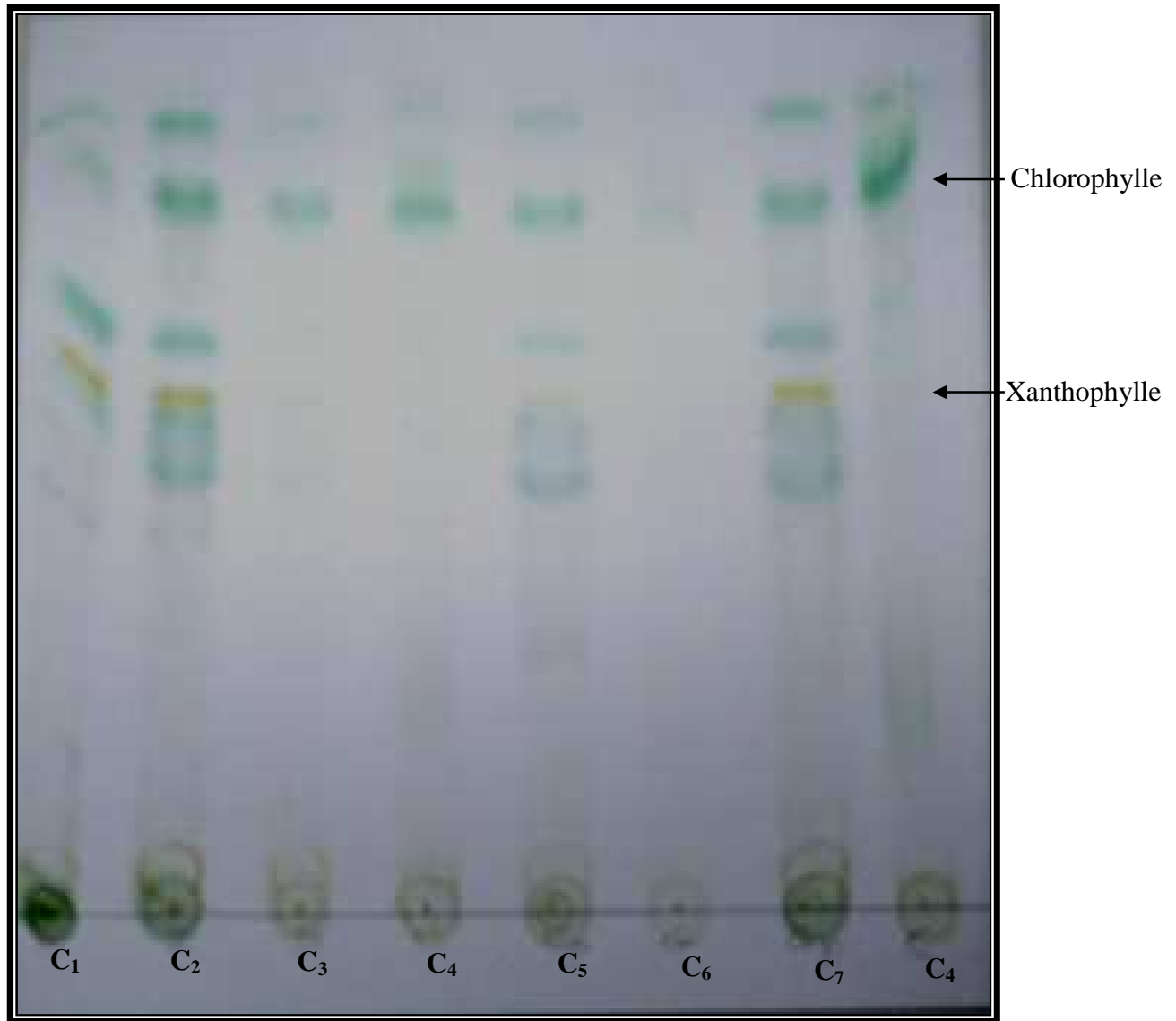


Figure 6 : séparation chromatographique des pigments photosynthétiques de *Arthrospira* sp. PCC 8005

C₁ : culture de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur milieu BG11.

C₂ : culture de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur milieu Zarrouk.

C₃ : culture de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur milieu "spir".

C₄ : culture de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur milieu à base d'eau thermale naturelle de la région de Constantine.

C₅ : culture de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur milieu à base d'eau thermale (pH 9.5) de la région de Constantine.

C₆ : culture dans de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur milieu à base d'eau thermale de la région de Guelma

C₇ : culture de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur milieu à base d'eau thermale (pH 9.5) de la région Guelma

- **Discussion :**

Les résultats du chromatogramme obtenu, nous montrent la présence de deux couleurs différentes de bandes : une couleur verte (chlorophylle) et une couleur jaune (xanthophylle), avec des positions différentes dans le chromatogramme.

Les deux couleurs de bandes correspondent chacune à un pigment bien défini, sont présentes dans les cultures de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur les milieux de culture : BG11 ; Zarrouk, "Spir", milieu à base d'eau carbonatée (pH 9.5) de Constantine; milieu à base d'eau carbonatée (pH 9.5) de Guelma. Cependant dans les cultures sur les milieux à base d'eaux carbonatées de Guelma et de Constantine, on observe une seule bande qui correspond à la chlorophylle.

L'absence de xanthophylle dans les cultures sur les milieux à base d'eaux carbonatées naturelles de Guelma et de Constantine, est peut être expliquée par les concentrations faibles de ce pigment dans ces deux milieux, et qui n'ont pas pu être détectées et caractérisées par la chromatographie par apport aux autres milieux.

3. 4. Conclusion :

La concentration en chlorophylle "a", est fonction de la quantité en biomasse dans chaque milieu de culture.

La concentration en phycocyanine, est en rapport avec la concentration de la source d'azote (NaNO_3) dans chaque milieu de culture.

La présence de xanthophylle a été détectée, dans les cultures de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur les milieux BG11 ; Zarrouk ; "Spir" ; milieu à base d'eau carbonatée (pH 9.5) de Constantine et milieu à base d'eau carbonatée (pH 9.5) de Guelma. En revanche nous n'avons pas réussi à mettre en évidence la présence de ce pigment dans les milieux à base d'eaux carbonatées naturelles de Guelma et de Constantine, et ceci est peut être dû à la concentration faible en biomasse dans ces même milieux.

Conclusion :

La recherche et les essais de purification du genre *Spirulina*, ont montré que l'espèce *Spirulina subsalsa* à été trouvée dans l'ensemble des échantillons d'eau prélevés à partir des sources thermales de la région de Guelma, cependant les différentes étapes d'enrichissement employées, n'ont pas permis l'obtention des culture pures.

L'étude de la croissance de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur les milieux classiques, ainsi que sur les milieux à base d'eaux carbonatées, a montré que :

- La croissance de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur tous les milieux classiques est généralement similaire.
- La croissance de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur les milieux à base d'eaux carbonatées des sources thermales de Guelma et de Constantine, est différente.

L'étude de la composition de *Arthrospira* sp. PCC 8005 en divers pigments a montré que :

- La concentration en chlorophylle "a", est fonction de la quantité en biomasse obtenue dans chaque milieu de culture.
- La concentration en phycocyanine est en rapport avec la concentration de la source d'azote (NaHCO_3) dans chaque le milieu de culture.
- La séparation chromatographique, a permis de mettre en évidence la présence de xanthophylle dans les cultures de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur les milieux BG11, Zarrouk, "Spir", milieu à base d'eau carbonatée (pH 9.5) de Constantine et milieu à base d'eau carbonatée (pH 9.5) de Guelma.

Perspectives :

Nous souhaitons poursuivre ce présent travail avec comme perspectives :

- Isolement des souches de *Spirulina* sp. à partir des eaux alcalines et des eaux de sources thermales en Algérie.
- Optimisation des conditions de culture de *Arthrospira* sp. PCC 8005 sur les milieux synthétisés avec les eaux thermales.
- Etude des phycocyanines produites.

Références bibliographiques :

- Aiba, S. et Ogawa, T. (1977).** Assessment of growth yield of a blue green alga: *Spirulina platensis*, in axenic and continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* Vol. 102:179-182.
- Alam, M.Z., Jalal, K.C.A. et Rafiqul, I.M. (2005).** Environmental Factors Optimisation of *Spirulina* biomass in laboratory culture. *Biotechnology.* Vol. 4:19-22.
- Annapurna, V. (1991).** Bioavailability of *Spirulina* carotenes in preschool children. *J. Clin. Biochem Nutrition.* Vol. 10:145-151.
- Anusuya, D.M. et Venkatarman, L.V. (1983).** Supplementary value of the proteins of the blue-green algae *Spirulina platensis* to rice and wheat proteins. *Nutr. Rep. Internat.* Vol. 28:1029-1035.
- Aychunie, S. (1996).** Inhibition of HIV-1 replication by an aqueous extract of *Spirulina platensis* (*Arthospira platensis*). *International Association of Applied Algology, 7th International Conference.*
- Ballot, A. (2004).** Cyanobacteria in Kenyan Rift Valley lakes – A biological and toxicological study. Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin 2004.
- Belay, A. (1997).** Mass culture of *Spirulina* outdoors .The Earthrise Farms experience.
- Blancheton, A. (1986).** Production d'Algues unicellulaires. Ifremer. Station de Palavas. Rapport 1985-86.
- Boumezbeur, A., Bouteldji, A. et Bahroune, M. (2003).** Fiche descriptive sur les zones humides Ramsar. Lac Noir, Wilaya d'El Tarf. rMinistère de l'Agriculture et du Développement Rural.Direction Générale des Forêts:1-6.
- Boumezbeur, A., Barkat, S. et Hoffmann L. (2004).** Atlas IV des zones humides Algériennes d'importance internationale. Direction Générale des Forêts. p. 1-107.
- Brahimi, R., Benaïcha, R., Ouahrani, S., Chebhouni, E.K., Hacène, N. et Siga, A. (2001).** Essais de Production de Protéines d'organismes Unicellulaires (P.O.U. par des Souches de *Spirulina*. *Rev. Energ. Ren.:* Production et Valorisation – Biomasse. p. 65-68
- Brient, L., Vézie, C. et Bertru, G. (2001).** Rapport final : Evaluation des efflorescences à cyanobactéries dans des eaux de cours d'eau et plans d'eau bretons. Université de Rennes I U.M.R. Ecobio 655335042 Rennes Cedex.
- Bujard, E., Braco, U., Mauron, J., Mottu, F., Nabholz, A., Wuhrmann, J.J. et Clément G. (1970).** Composition and Nutritive Value of Blue Green Algae (*Spirulina*) and their Possible Use in Food Formulations. *3rd.international Congress of Food Science and Technology, Washington .*
- Cardellina, I.J.H., Marnier, F.J. et Moore, R.E. (1979).** Seaweed dermatitis: structure of lyngbyatoxin A. *Science.* Vol. 204: 193-195.
- Carvalho, J.C.M., Pelizer, L.H. et Sato, S. (2002).** *Spirulina platensis* growth estimation by pH determination at different cultivations conditions. *Journal of Biotechnology.* Vol. 5: 251-256.

- Castenholz, R.W. (2001).** Phylum BX. Cyanobacteria. Oxygenic Photosynthetic Bacteria. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 1: The Archaea and the Deeply Branching and Phototropic Bacteria. Second Edition.* G. Garrity, D. R. Boone, and R. W. Castenholz (eds.) Springer-Verlag, New York.
- Challem, J.J., Passwater, R.A. et Mindell, E.M. (1981).** *Spirulina*. Keats Publishing, Inc. New Canaan, Connecticut.
- Charppy, L. (2004).** Colloque international : CSSD « Les Cyanobactéries pour la Santé, la science et le Développement ». IRD. p. 1-58.
- Ciferri, O. (1983).** *Spirulina*, the Edible Microorganism. *Microbial. Rev.* Vol. 47:551-578.
- Clément, G., Giddey, C. et Menzi, R. (1967).** Amino Acid Composition and Nutritive Value of the Alga *Spirulina maxima*. *J. Sci. Fd. Agric.* Vol. 18: 497-501.
- Clément, G. (1975).** Production et constituants caractéristiques des algues *Spirulina platensis* et *Spirulina maxima*. *Ann. Nutr. Aliment.* Vol. 29 : 477-487.
- Compère, P. (1974).** Algues de la Région lac Tchad : II les cyanophycées. *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. hydrobiol.* Vol. III, n° 3/4 :165-198.
- Congming, L. et Avigad, V. (1999).** Characterization of PSII photochemistry in salt-adapted cells of cyanobacterium *Spirulina platensis*. *New. Phytol.* Vol. 141 : 231-239
- Debois, C. (2007).** Mise au point d'une méthode de lyse cellulaire et évaluation d'un test de terrain pour la mesure des microcystines libérées par les cyanobactéries dans les eaux de surface. Centre d'expertise en analyse environnementale. Québec. p. 1-17.
- Desikachary, T.V. (1959).** Cyanophyta. *Indian Council of Agriculture Research, Monographs on Algae.* p. 686. New Delhi, India.
- Doke, J.M. (2005).** An Improved and Efficient Method for the Extraction of Phycocyanin from *Spirulina* sp. *International Journal of Food Engineering.* Vol. 1(2):1-11.
- Falquet, J. (1996).** Spiruline : aspects nutritionnels. *Antenna Technologie.* Vol. 29, r. de Neuchâtel CH-1201 Genève, Suisse. P. 1-16.
- Farrar, W.V. (1966).** Techuitlatl, a Glimpse of Aztec Food Technology. *Nature.* N° 5047.
- Fauci, A.S. (1989).** VitaminB12 malabsorption in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Arch-Intern-Med.* Vol.149 (9): 2039-2041.
- Fedkovik, Y., Astre, C., Pinguet, F., Gerber, M., Ychou, M. et Piujo, H. (1993).** Spiruline et cancer. *Spiruline, algue de vie* ; bulletin de l'Institut Océanographique de Monaco N° spécial 12 – Monaco, Musée océanographique. p. 117-119.
- Feldmann, J., Chadefaud, M., Ferré, Y., Gaussen, H., Grassé, P., Prévot, A. R. et Abbayes, H. (1978).** Précis de botanique : I : végétaux inférieurs. 2^{ème} édition. p. 77-79.
- Feng, D. et Wu, Z. (2006).** Culture of *Spirulina platensis* in human urine for biomass production and CO₂ evolution. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B.* Vol. 7(1): 34-37.

Fox, R. D. (1999). La spiruline : technique, pratique et promesse. *Edisud*: 246. ISBN 2-7449-0100-8. p. 18-129.

Fujiki, H., Suganuma, M., Suguri, H., Yoshizawa, S., Takagi, K., Nakayasu, M., Ojika, M., Yamada, K., Yasumoto, T., Moore, R.E. et Sugimura, T. (1990). New tumor promoters from marine natural products. In *Marine Toxins: origin, structure and molecular pharmacology*. Halls & Strichartz G. (eds). Washington D.C. American Chemical Society p. 232-240.

Geitler, L. (1932). Cyanophyceae. In: Rabenhorst's Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz, Leipzig, Akad. Verslagsges. 1932. Reprinted 1971, New York, Johnson. p. 1-1196.

Guglielmi, G., Rippka, R. et Tandeau Demarsac, N. (1993). Main properties that justify the different taxonomic position of *Spirulina* spp. and *Arthrospira* spp. Among cyanobacteria. *Bull. Inst. Oceanogr.* Vol. 12: 13-23.

Gustafson, K. (1989). AIDS- Antiviral sulfolipids from cyanobacteria (blue-green algae). *Journal of the National Cancer Institute.* Vol. 81(16):1254.

Guyton, A.C. (1986). Textbook of Medical Physiology. 7th. ed. W.B. Saunders Company.

Harriman, G.R., Smith, P.D., Horne, M.K., Fox, C.H., Koenig, S., Lack, E.E., Lane, H.C., Hayashi T., Hayashi, K. (1996). Calcium spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga *Spirulina*. *Journal of Natural Products.* Vol. 59(1) :83-87.

Hindak, F. (1985). Morphology of trichomes in *Spirulina fusiformis* Vorochnin from Lake Bogoria. *Kenya. Arch. Hydrobiol./Suppl.* Vol. 71: 201-218.

Hudson, B.J.F. et Karis, I.G. (1974). The Lipids of the Alga *Spirulina*. *J. Sci. Fd. Agric.* Vol. 25:759-763.

Iltis, A. (1970). Phytoplankton des eaux natrantes du Kanem (Tchad) III. Variations annuelles du plancton d'une mare temporaire. *Cah. O.R.S.T.O.M, sér. Hydrobiol.* Vol. II : 63-59.

Iltis, A. (1970). Phytoplankton des eaux natronnés du Kanem (Tchad) IV. Note sur les espèces du genre *Oscillatoria*, sous-genre *Spirulina* (Cyanophyta). *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Hydrobiol.* Vol. IV : 130-134.

Johnson, P. et Shubert, E. (1986). Availability of iron to rats from *Spirulina*, blue-green algae. *Nutrition Research.* Vol. 6: 85-94.

Lanfaloni, L., Cappanna, E. et Gualerzi, C.O. (1994). Isolation and characterization of a chlorate-resistant mutant of *Spirulina platensis*. *New Microbio.* Vol. 17(2):133-40.

Lamela, T. et Marquez, F.J. (2000). Phycocyanin production in seawater culture of *Arthrospira maxima*. *Ciencias marinas.* Vol. 26(4) :607-619.

Levi, Y., Harvey, M. et Cervantès, P. (2006). L'évaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et de leurs toxines dans les eaux destinées à l'alimentation, à la baignade et autres activités récréatives. *Afseet* agence française de sécurité sanitaire et de l'environnement. p. 1-231.

Léonard, J. (1968). Discovery, ecology and nutritional utilization of *Spirulina platensis*. Communication à la réunion du Swedish. Council for Applird Research, Stockholm, 11.

Loirié, Y. (1975). Aide mémoire de chimie analytique. *Editions de Mouscou.*

Loukkas, A. (2006). Atlas des parcs nationaux algériens. Direction Générale des Forêt .Parc national de Théniet El Had. p.1-96.

Mani, U.V., Sangeeta, S., Iyer, U.M. et Subramanian, S.R. (1996). Studies on the effect of *Spirulina* supplementation in Control of Diabetes Mellitus. Cyanobacterial biotechnology: proceedings of the International Symposium, *Oxford & IBH Publishing CO.PVT.LTD.* p. 301-304.

Manen, J.F. et Falquet, J. (2002). The *cpcB-cpcA* locus as a tool for the genetic characterization of the genus *Arthrospira* (Cyanobacteria): evidence for horizontal transfer. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* Vol. 52 : 861-867.

Mary, I. (2003). Mécanismes moléculaires au stresses environnemaux chez la cyanobactéries marine *Prochlorococcus*. Thèse, Université de Rennes I. p. 1-151.

Minkova, K.M., Tchernov, A.A., Tchorbadjieva, M.I., Fournadjieva, S.T., Antova, R.E. et Busheva, M.C. (2003). Purification of C-phycoocyanin from *Spirulina (Arthrospira) fusiformis*. *Journal of Biotechnology.* Vol. 102: 55-59.

Motten, A. F. (2004). Diversity of Photosynthetic pigments. *Association for Biology Laboratory Education (ABLE).* p. 81-97.

Mynderse, J.S., Moore, R.E.,Kashiwagi, M., Norton, T.R. (1977). Antileukemia activity in the Oscillatoriaceae:isolation of debromoaplysiatoxin from *Lyngbya*. *Science.*Vol.196: 538-540.

Muhling, M., Somerfield, Harris, N., Belay, A. et Whitton, B. (2006). Phenotypic analysis of *Arthrospira (Spirulina)* strains (cyanobacteria). *Phycologia.* Vol. 45 (1): 95-104.

Nelissen, B., Willmotte, A., Neefs, J. M. et Wachter, R. (1994). Phylogenetic relation ships among filamentous helical cyanobacteria investigated on the basis of 16S ribosomal RNA gene sequence analysis. *Systematic and Applied Microbiology.* Vol. 17 : 206-210.

Ozando, P. (2000). Les végétaux : organisation et diversité biologique. 2^{ème} édition. *Dounod.* p. 9-11.

Palla, J.C. et Busson, F. (1969). Etude des caroténoïdes de *Spirulina platensis* (Gom.) Geitler (Cyanophycées). *C.R. Acad. Sc. Paris,* t.269. p. 1704-1707.

Pang, Q. S., Guo, B. J. et Ruan, J. H. (1988). Enhancement of endonuclease activity and repair DNA synthesis by polysaccharide of *Spirulina platensis*. *I-Chuan-Hsueh-Pao* Vol. 15(5) :374-381.

Pelmont, J. (1992). Bactéries et environnement, Adaptations physiologiques. Volume II. Publications Univ., Collection Grenoble Sciences. p. 467-469.

Qishen, P. et Kolman, I. (1989). Radioprotective effect of extract from *Spirulina* in mouse bone marrow cells studied by using the micronucleus test. *Toxicology Letters.* Vol. 48 :165-169.

Quillet, M. (1975). Recherches sur les substances glucidiques élaborées par les spirulines. *Ann. Nutr. Aliment.* Vol. 29:553-561.

Richmond, A. (1986). Handbook of microalgal mass culture. *CRC Press.* p. 212-213.

- Rippka, R. (1988).** Isolation and purification of cyanobacteria. *Methods Enzymol.* Vol. 167: 3-27.
- Rule, S.A., Hooker, M., Costello, C., Luck, W. et Hoffbrand, A.V. (1994).** Serum vitamin B12 and transcobalamin levels in early HIV disease. *Am-J-Hematol.* Vol. 47(3) : 167-71.
- Sall, M.G., Dankoko, B., Badiane, M., Ehua, E. et Kuakuwi, N. (1999).** La spiruline : une source alimentaire à promouvoir. *Médecine d'Afrique Noire.* Vol. 46 (3): 140-141.
- Salés, S. (2004).** Compte-rendu du Mini-colloque sur la spiruline à Tamanrasset. Association Targuinca.
- Santillan, C. (1974).** Cultivation of the *Spirulina* for Human Consumption and for Animal Feed. *International Congress of Food Science and Technology.* Madrid (Spain).
- Scheldeman, P., Baurain, D., Bouhy, R., Scott, M., Muhling, M., Whitton, B.A., Belay, A. et Wilmotte, A. (1999).** *Arthrospira (Spirulina)* strains from four continents are resolved into only two clusters, based on amplified ribosomal DNA restriction analysis of the internally transcribed spacer. *Fems Microbiology Letters.* Vol. 172: 213-222.
- Schwartz, J. et Shklar, G. (1987).** Regression of experimental hamster cancer by beta-carotene and algae extracts. *J. Oral. Maxillofac. Surg.* Vol. 45(6): 510-5
- Schwartz, J. et Shklar, G. (1988).** Prevention of experimental oral cancer by extracts of *Spirulina- dunaliella* algae. *Nutr Cancer.* Vol. 11:127-134.
- Silvano, J. (2005).** Toxicité des cyanobactéries d'eau douce vis à vie des animaux domestiques et sauvages. Thèse, Université Claude Bernard - Lyon. (Médecine - Pharmacie). p. 1-116.
- Thajuddin, N. et Subramanian, G. (2005).** Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. National Facility for Marine Cyanobacteria, Department of Microbiology. *Current Science.* Vol. 89 :1-10.
- Thomazeau, S. (2006).** Diversité phylogénétique et toxinique des cyanobactéries du Sénégal et du Burkina Faso. Thèse, Université Pierre et Marie Curie- Paris 6. p. 6-7.
- Tomaselli, L, Margheri, M.C. et Sacchi, A. (1995).** Effects of light on pigments and photosynthetic activity in a phycoerythrin-rich strain of *Spirulina subsalsa*. *Aquatic Microbial ecology.* Vol. 9: 27-31.
- Tomasselli, L. (1997):** Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira (Spirulina) maxima* and *Arthrospira (Spirulina) platensis*. In: VONSHAK, A. (Ed.), *Spirulina platensis (Arthrospira)*. Physiology, Cell-Biology and Biotechnology. p. 1-17. Taylor and Francis, London.
- Ulrich, N., Ferran, G. et Gerard, M. (2000).** The halotolerance and phylogeny of cyanobacteria with tightly coiled trichomes (*Spirulina Turpin*) and the description of *Halospirulina tapeticola* gen. nov. sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* Vol. 50 : 1265–1277.
- Vermorel, M., Toullec, G., Dumond, D. et Pion, R. (1975).** Valeur énergétique et protéique des algues bleues spirulines supplémentées en acides aminés : utilisation digestive et métabolique par le rat en croissance. *Ann.Nutr. Aliment.* Vol. 29: 535-552.

Yi-Ming, Z. et Feng, C. (1999). A simple method for efficient separation and purification of c-phycocyanin and allophycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biotechnology Techniques*. Vol. 13: 601-603.

Webographie :

Site web 1. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/x0169f/X0169F05.pdf>.

Cyanobactéries (Algues bleues) : Caractéristiques utiles pour l'identification.

Site web 2. [Pagesperso-orange.fr/Cyanobactéries/pages/Physiologie/FixationN₂.htm](Pagesperso-orange.fr/Cyanobactéries/pages/Physiologie/FixationN2.htm).

ANNEXE I

Tableau 1 : composition des milieux de culture pour l'isolement des cyanobactérie (sol et d'eau douce) (Rippka, 1988).

Composants (mM)	No11	ASM-1	BG11	Z8	SAG 1	BBM	AA	KMC	Cg10	Kn	D
NaNO ₃	5.84	2.00	17.65	5.49	-	2.94	-	-	11.7	11.76	8.24
KNO ₃	-	-	-	-	1.98	-	20	9.89	-	-	0.99
K ₂ HPO ₄	0.22	0.10	0.18	0.18	-	0.43	2	5.74	0.29	4.38	-
KH ₂ PO ₄	-	-	-	-	0.15	1.29	-	-	-	-	-
Na ₂ HPO ₄	-	0.10	-	-	-	-	-	-	-	-	0.78
MgSO ₄	0.30	0.20	0.3	0.10	0.08	0.3	1	1.01	1.02	1.01	0.41
MgCl ₂	-	0.20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CaSO ₄	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.35
CaCl ₂	0.24	-	0.25	-	-	0.17	0.5	-	-	0.24	-
Ca(NO ₃) ₂	-	-	-	0.25	-	-	-	0.11	0.11	-	-
NaCl	-	-	-	-	-	0.43	4	-	-	-	0.14
Na ₂ CO ₃	0.19	-	0.19	0.20	-	-	-	-	-	-	-
Na ₂ SiO ₄	0.20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NTA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.52
EDTA	0.003	0.020	-	-	-	-	0.07	-	-	0.018	-
Na ₂ -EDTA	-	-	-	0.01	0.011	0.134	-	-	0.02	0.005	-
Na ₂ -Mg -EDTA	-	-	0.003	-	-	-	-	-	-	-	-
Acide citrique	0.029	-	0.029	-	-	-	-	-	-	-	-
Trisodium citrate	-	-	-	-	-	-	-	0.561	-	0.561	-
Citrate ferrique	0.018	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrate-Fe-ammonicale	-	-	0.03	-	-	-	-	-	-	-	-
FeCl ₃	-	0.004	-	0.01	-	-	-	-	-	-	0.002
FeSO ₄	-	-	-	-	0.01	0.018	0.07	-	-	0.018	-
Fe ₂ (SO ₄)	-	-	-	-	-	-	-	0.008	0.008	-	-
Glycylglycine	-	-	-	-	-	-	-	-	3.8	-	-
Extrait de sol	-	-	-	-	3%(v/v)	-	-	-	-	-	-
pH ajusté après autoclave	-	-	-	-	-	-	-	-	8.2	-	8.2
Solution de sels métalliques	Graff-ron	A ₅	A ₅ +C o	Graf-ron	A ₅ + Co	H ₅ +B	A ₅ + B ₆	A ₅	A ₅ + Co	A ₅ + Co	A ₅ + Co

ANNEXE II

Tableau 2 : composition des milieux de cultures pour l'isolement de cyanobactéries des habitats hyper alcalins (Rippka, 1988).

Composants (mM)	ASM-III	MN	RC	B	AO
NaCl	427	-	2137	2735	17.1
KCl	6.7	-	33.5	-	-
CaCl ₂	3.4	0.12	3.4	-	0.27
CaSO ₄	-	-	-	0.35	-
K ₂ SO ₄	-	-	-	-	5.7
MgSO ₄	14.2	0.15	14.2	0.41	0.81
MgCl ₂	9.8	-	49.2	-	-
K ₂ HPO ₄	0.09	0.09	0.09	-	2.9
Na ₂ HPO ₄	-	-	-	0.78	-
NaNO ₃	8.8	8.8	8.8	8.1	29.4
KNO ₃	-	-	-	1	-
NaHCO ₃	-	-	-	-	162
Na ₂ CO ₃	0.19	0.19	0.19	-	38
NTA	-	-	-	0.52	-
Na ₂ -EDTA	0.0013	0.0013	0.0013	-	0.22
Acide citrique	0.014	0.014	0.014	-	-
Citrate- Fe- amoniale	0.015	0.015	0.015	-	-
FeCl ₃	-	-	-	0.0018	-
FeSO ₄	-	-	-	-	0.036
Tris	-	-	-	-	-
Eau de mer	-	75%(v/v)	-	-	-
pH ajusté après autoclave	-	-	-	8.2	-
Solution de sels métalliques	A ₅ +Co	A ₅ +Co	A ₅ +Co	A ₅ +Co	A ₅ +B ₆

ANNEXE III

Tableau 3 : composition des solutions de sels métalliques employées pour les différents milieux (Rippka, 1988)

Solutions	Concentration des composants en g/liter
Graffron	H ₃ BO ₃ :3.1, MnSO ₄ 4H ₂ O:2.23 , ZnSO ₄ 7H ₂ O:0.287,(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O:0.088 , CuSO ₄ 5H ₂ O:0.125 ,Co(NO ₃) ₂ 6H ₂ O:0.146 ,AL ₂ (SO ₄)K ₂ SO ₄ 24H ₂ O: 0.474, NiSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ 6H ₂ O :0.198, Cd(NO ₃) ₂ 4H ₂ O :0.154,Cr(NO ₃) ₂ 7H ₂ O :0.037, V ₂ O ₄ (SO ₄) ₃ 16H ₂ O:0.035,Na ₂ WO ₄ 2H ₂ O : 0.033, KBr :0.119,KI:0.083 Volume additionné : 1ml /litre de milieu de culture.
A₅+B₆	Solution A: H ₃ BO ₃ :2.86, MnSO ₄ 4H ₂ O:2.03, ZnSO ₄ 7H ₂ O:0.222 , MoO ₃ : 0.15, CuSO ₄ 7H ₂ O:0.079. Solution B : (composants dissous dans 0.1 NH ₂ SO ₄) : Co(NO ₃) 6H ₂ O :0.049 ,NiSO ₄ 6H ₂ O :0.045 , Cr ₂ (SO ₄) ₃ K ₂ SO ₄ 24H ₂ O :0.096 , NH ₄ VO ₃ :0.023 ,NaWO ₄ 2H ₂ O :0.018 ,TiO(C ₂ O ₄ K) _x YH ₂ O (ce composant est préparé par précipitation avec NH ₄ OH d'une solution contenant 0.074 g de TiO(C ₂ O ₄ K) ₂ 2H ₂ O puis filtration et suspension dans 0.1 NH ₂ SO ₄ avant addition au solution B. Volume additionné de chaque solution : 1ml / litre de milieu
A₅+Co	H ₃ BO ₃ :2.86 ,MnCl ₂ 4H ₂ O :1.81 ,ZnSO ₄ 7H ₂ O :0.22 , Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O :0.39 ,CuSO ₄ 5H ₂ O :0.079, Co(NO ₃) ₂ 6H ₂ O :0.049. Volume additionné : 1ml / litre de milieu.

ANNEXE IV

1. Milieux de culture utilisés :

1. 1. Milieu BG11 : (Rippka, 1988) :

1. 1. 1. Composition :

NaNO ₃	1.5 g
K ₂ HPO ₄	0.04g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.075g
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0.036g
Acide citrique, 1H ₂ O	0.06 g
EDTA disodique	0.001g
Na ₂ CO ₃	0.02g
Citrate de fer ammoniacal	0.006g
Eau distillée	1000 ml
Solution de sels métalliques	1ml

1. 1. 2. Préparation :

Après dissolution de tous les ingrédients dans l'eau distillée, ajuster à différents pH (7, 8,8.5, 9 et 10) et stériliser à 120 °C pendant 20 min

• Milieu BG11 solide

Ajouter 15 g d'agar par litre de milieu et couler en boîtes de Pétri après stérilisation à l'autoclave.

1. 2. Milieu Zarrouk (Feng *et al.*, 2006) :

1. 2. 1. Composition:

NaHCO ₃	18.0 g
NaNO ₃	2.5 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
K ₂ SO ₄	1.0 g
NaCl	1.0 g
CaCl ₂	0.04 g
Na ₂ EDTA	0.08 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.2 g
FeSO ₄ , 7H ₂ O	0.01 g
Eau distillée	1000 ml
Solution de sels métalliques	1 ml

• **Composition de solution de sels métalliques (TE):**

H ₃ BO ₃	2.86g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.02g
MnCl ₂ , 4H ₂ O	1.8g
Cu ₂ SO ₄	0.08g
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0.22g
Eau distillée	1000 ml

1. 2. 2. Préparation :

Après dissolution de tous les ingrédients dans l'eau distillée, ajuster le pH à 9.5 et stériliser à 120 °C pendant 20 min.

1. 3. Milieu Spirulina ou "Spir"(Aiba et Ogawa, 1977) :

1. 3. 1. Composition:

Solution I:

NaHCO ₃	13.61g
Na ₂ CO ₃	4.03g
K ₂ HPO ₄	0.05g
Eau distillée	500ml

Solution II:

NaNO ₃	2.50g
K ₂ SO ₄	1.00g
NaCl	1.00g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.20g
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0.04g
FeSO ₄ , 7H ₂ O	0.01g
EDTA	0.08g
Eau distillée	500ml
Solution de sels métalliques (A ₅ +Co)	5 ml

1. 3. 2. Préparation :

Après dissolution de tous les ingrédients dans l'eau distillée. Stériliser à l'autoclave à 120 °C pendant 20 min les solutions I et II séparément, mélanger après refroidissement et ajouter 5 X 10⁻⁶ g/l vitamine B₁₂ dans le milieu stérile.

1. 4. Milieu Jourdan (Fox, 1999) :

1. 4. 1. Composition:

NaHCO ₃	8g
Sel marin	5g
(NH ₂) ₂ CO	0.1g
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.1g
K ₂ SO ₄	0.1g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.2g
FeSO ₄	0.001g
Eau distillée	1000ml

1. 4. 2. Préparation :

Après dissolution de tous les ingrédients dans l'eau distillée, ajuster le pH à 8 et stériliser à 120 °C pendant 20 min.

1. 5. Milieu de MN (Rippka, 1988) :

1. 5. 1. Composition:

CaCl ₂	0.018g
MgSO ₄	0.038g
K ₂ HPO ₄	0.02g
NaNO ₃	0.75g
Na ₂ CO ₃	0.02g
EDTA	0.0005g
Acide citrique	0.003g
Citrate de fer amoniale	0.003g
Eau distillé	250ml
Eau de mer	750ml
Solution de sels métalliques (A ₅ +Co)	1ml

1. 5. 2. Préparation :

Après dissolution de tous les ingrédients dans l'eau distillée, stériliser séparément l'eau de mer filtrée et la solution contenant tous les sels à l'autoclave à 120 °C pendant 20 min.

1. 6. Eau carbonatée de sources thermales de la region de Guelma :

1. 6. 1. Composition:

Calcium	246, 39 mg/l
---------	--------------

Magnesium	43,89mg/l
Sodium	33,63mg/l
Potassium	6.22mg/l
Clorure	50mg/l
Sulfates	500mg/l
Bicarbonates	353,3mg/l
Nitrates	7mg/l
pH=6.37	

1. 6. 2. Préparation :

Ajuster à différents pH (9, 9,5) et stériliser à 120 °C pendant 20 min.

1. 7. Eau carbonatée de Ain Skhouna de la region de Constantine:

1. 6. 1. Composition:

Calcium	110 mg/l
Magnesium	27mg/l
Sodium	78mg/l
Clorure	130mg/l
Sulfates	110mg/l
Bicarbonates	200mg/l
pH =7.7	

1. 6. 2. Préparation :

Ajuster à différents pH (9 et 9,5) et stériliser à 120 °C pendant 20 min.

1. 8. Milieu à base d'eau de mer (Charpy, 2004) :

1. 7. 1. Composition :

K ₂ HPO ₄	0.5 g
NaNO ₃	3g
NaHCO ₃	11g
FeSO ₄	0.01g
Urée	0.2g
Eau de mer	1000ml

1. 7. 2. Préparation :

Après précipitation de l'eau de mer avec NaHCO₃ pendant 2 heures à 35 °C, L'eau de mer traitée est enrichie avec d'abord NaNO₃, FeSO₄, puis un autre enrichissement avec K₂HPO₄, FeSO₄, urée. Stériliser à 120 °C pendant 20 min.

2. Colorants :

2. 1. Solution du lugol :

Iode	10g
Iodure de potassium	20g
Eau distillée	1000ml

3. Solutions d'antibiotiques :

3. 1. Composition :

PénicillineG	200mg
Chloramphénicol	20 mg
Amoxicilline	100mg
Céfazoline	100mg
Ampicilline	100mg
Oxacilline	100mg
Gentalline	100mg
Streptomycine	100mg
Ethanol	2ml
Eau distillée	20ml

3. 2. Préparation :

• Solution n° 1 (S₁) (Fox, 1999) :

Dissoudre 200mg de pénicilline G et dans 20ml d'eau distillée. Ajouter 20mg de chloramphénicol dissous dans 2ml d'éthanol à 95 %.

• Solution n° 2 (S₂) :

Dissoudre 100mg d'amoxicilline dans 10ml d'eau distillée. Ajouter 10mg de chloramphénicol dissous dans 1ml d'éthanol à 95 %.

• Solution n° 3 (S₃) :

Dissoudre 100mg de céfazoline dans 10ml d'eau distillée. Ajouter 10mg de chloramphénicol dissous dans 1ml d'éthanol à 95%.

• Solution n° 4(S₄) :

Dissoudre 100mg d'ampicilline dans 10ml d'eau distillé. Ajouter 10mg de chloramphénicol dissous dans 1ml d'éthanol à 95%.

• Solution n° 5 (S₅) :

Dissoudre 100mg d'oxacilline dans 10ml d'eau distillée .Ajouter 10mg de chloramphénicol dissous dans 1ml d'éthanol à 95%.

• **Solution n° 6 (S₆) :**

Dissoudre 100mg de gentalline dans 10ml d'eau distillée. Ajouter 10mg de chloramphénicol dissous dans 1ml d'éthanol à 95%.

• **Solution n° 7 (S₇) :**

Dissoudre 100mg de pénicilline G +100mg d'amoxicilline +100mg de céfazoline + 100mg d'ampicilline + 100mg d'oxacilline + 100mg de gentalline dans 60ml d'eau distillée. Ajouter 60mg de chloramphénicol dissous dans 6ml d'éthanol à 95%.

• **Solution n° 8 (S₈) :**

Dissoudre 100mg d'amoxicilline + 100mg de cefazoline dans 20ml d'eau distillée. Ajouter 20mg de chloramphénicol dissous dans 2ml d'éthanol à 95%.

• **Solution n° 9 (S₉) (Palavas, 1985) :**

Dissoudre 5mg de pénicilline G + 1.6mg streptomycine dans 1ml d'eau distillée. Ajouter 0.2mg chloramphénicol dissous dans 1ml d'éthanol à 95%.

4. Autres solutions :

4. 1. Solution de tampon à pH =7 (Lourié, 1975) :

4. 1. 1. Composition :

Solution A :

KH₂PO₄ 9.073g

Solution B:

Na₂HPO₄ 11.866g

4. 1. 2. Préparation:

Mélanger 61.2ml de solution B avec 38.8ml de solution A, pour 100ml de solution de tampon (pH 7).

4. 2. Solution pour ajustement de pH à 9.5 :

4. 2. 1. Composition:

NaHCO₃ 10.8g

Na₂CO₂ 7.6g

4. 2. 2. Préparation :

Après dissolution de tous les ingrédients des différents milieux dans l'eau distillée ; ajouter les composants de la solution précédente.