



UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA
Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie
Département Des Sciences Biologiques



Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de
MASTER ACADEMIQUE

Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité : Biochimie appliquée

Présenté par :

ABABSA Siham
BENEDDINE Djedla

Thème

**Evaluation de l'activité anticoagulante d' exopolysaccharides
issus de *Dunaliella salina* isolées à partir du Chott Ain El-Beida
de la cuvette de Ouargla**

Soutenu publiquement

Le : 25/06/2018

Devant le jury :

Présidente	OULD EL HADJ KHELIL Aminata	Professeur	U.K.M Ouargla
Examineur	BOUAL Zakaria	M.C.A.	U.K.M Ouargla
Encadreur	HADJADJ Soumia	M.C.B.	U.K.M Ouargla
Co-encadreur	BENYAHKEM Meriem	M.A.	U.K.M Ouargla

Année universitaire : 2017/2018

Remerciements

Avant tout, je remercie **ALLAH** tout puissant de m'avoir donné le courage, la force, la volonté et la patience pour réaliser ce travail.

Nous adressons nos sincères remerciements à notre promotrice **M^{lle} HADJADJ Soumia**, Maître de conférences au Département des Sciences Biologiques à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Kasdi Merbah-Ouargla, et notre Co-promotrice **M^{lle} BENYAHKEM Meriem**, doctorante au Département des Sciences Biologiques à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Kasdi Merbah-Ouargla, qui nous a encadrés et dirigés ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'il nous accordés nous ont permis de réaliser ce travail.

Nous tiens à remercier **M^{me} OULD ELHADJ-KHELIL Aminata**, Professeur au Département des Sciences biologiques à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Kasdi Merbah-Ouargla, qui nous fait l'honneur de présider ce jury.

Nous présentons nos remerciements les plus sincères à **Mr BOUAL Zakaria** Maître de conférences au Département des Sciences Biologiques à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Kasdi Merbah-Ouargla, d'avoir accepté d'examiner ce travail, mais aussi pour votre présence et vos conseils tout au long de notre cursus Universitaire.

Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont aussi au Professeur **Mr OULD EL HADJ Mohamed Didi**, du Département des Sciences Biologiques de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'Université KASDI Merbah-Ouargla, pour son intérêt à notre travail, pour ses conseils scientifiques et ses précieuses aides.

Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont aussi aux membres des laboratoires pédagogiques et de la recherche « **Protection des Ecosystèmes en Zones Arides et Semi-arides** » de l'Université KASDI MERBEH, Ouargla.

Nous remercions les personnes de Laboratoire d'analyse médical « **IBN ROCHD** » Ghardaïa, et en particulier son Directeur, **Dr. AMMI SAÏD Mustapha** de nous avoir accueilli au sein du Laboratoire.

Enfin, Nous remercions nos parents bien sûr pour leurs soutiens et encouragements tout le long de notre études et notre vie, Nous remercions ainsi nos amies et toute nos famille.

Liste des tableaux

Tableau I: Différents modes de nutrition pouvant être utilisés par les microalgues (MICHAUD, 2016).	8
Tableau II:- Méthode de dilution de l'extrait exopolysaccharidique.	32
Tableau III: Paramètres physico-chimique des échantillons de l'eau du Chott Ain El Beida .	35
Tableau IV: Diatomées observées dans la préculture.	36
Tableau V: Cyanobactéries observées dans la préculture	37
Tableau VI: Chlorophycées observées dans la préculture	37

Liste des figures

Figure 01: Structures cellulaires de microalgues unicellulaire (eucaryotes) (A) et cyanobactérie (procaryotes) (B) (PRESCOTT, 1995).	7
Figure 02: Représentation schématique des différents stades du cycle de vie de l'espèce <i>Dunaliella salina</i> (MYRIAM, 2013).	19
Figure 03: Délimitation de la cuvette de Ouargla	21
Figure 04: Schéma d'un filet à plancton.	24
Figure 05: Préparation des cultures unialgales par dilution (BELCHER et SWALE, 1982)...	27
Figure 6: Représentation schématique des étapes d'isolement et purification des microalgues.	30
Figure 07: Capacité anticoagulante exprimée en temps de céphaline activé (TCA) des EPS issus de <i>D.salina</i>	42
Figure 08: Capacité anticoagulante exprimée en temps de quick (TQ) des EPS issus de <i>D.salina</i>	44

Liste des photos

Photo 01 : Chott Ain El Beida.....	22
Photo 02: Identification micromorphologique des chlorophycées (<i>Dunaleilla salina</i>).....	38
Photo 03: Identification micromorphologique des Diatomées (<i>Navicula sp.</i>).....	38
Photo 04: Observations macroscopique (a) et microscopiques(b, c et d) des colonies de <i>D.salina</i>	40
Photo 05: Observations macroscopique (a) et microscopiques (b, c et d) des colonies de <i>Navicula sp.</i>	41

Table des matières

Remerciements	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des photos	
Résumés	
Introduction	1

Chapitre I: Synthèse bibliographique

I-Aperçu générale sur les microalgues	6
I.1.-Définition.....	6
I.2.-Diversité et classification.....	6
I.2.1.- Eucaryote	6
I.2.2.-Procaryote	7
I.3.-Mode trophique des microalgues.....	7
I.4.-Mode de reproduction des microalgues.....	8
I.5.-Facteurs de production.....	9
I.5.1.-Energie lumineuse	9
I.5.2.-Température.....	9
I.5.3.-pH	9
I.5.4.-Dioxyde de carbone	10
I.5.5.-Nutriments	10
I.5.6.-Agitation	11
II- Aperçu générale sur les polysaccharides des microalgues.....	11
II.1.-Généralités.....	11
II.2.-Différentes types des polysaccharides des microalgues.....	11
II.2.1.-Polysaccharides fibrillaires	12
II.2.2.-Polysaccharides de réserve.....	12
II. 2.3.-Exopolysaccharides	12

II.3.-Activités biologiques des EPS.....	13
II.3.1.-Activité antivirale.....	13
II.3.2.-Activité antioxydante.....	14
II.3.3.-Activite anti inflammatoire et immunomodulateur.....	14
II.3.4.-Activité anticoagulante et antithrombotique.....	15
III- Présentation du modèle d'étude.....	16
III.1.-Généralités sur <i>Dunaliella salina</i>	16
III.2.-Description morphologique.....	17
III.3.-Taxonomie.....	17
III.4.-Reproduction.....	18

Chapitre II: Matériel et méthodes

I-Présentation de la région d'étude.....	21
I.1.-Chott Ain El-Beida.....	22
II-Principe d'étude.....	22
III-Méthodologie de travail.....	23
III.1.-Récolte des échantillons.....	23
III.2.-Analyses physico-chimiques des échantillons.....	24
III.3.-Examen microscopiques des échantillons.....	24
III.4.-Préparation de la préculture.....	25
III.4.1.-Mode opératoire.....	25
III.5.-Isolement et purification des souches.....	25
III.5.1.-Isolement des souches par dilution.....	25
III.5.1.1.-Mode opératoire.....	26
III.5.2.-Purification par repiquages successifs dans un milieu solide.....	28
III.5.2.1.-Préparation des milieux solides gélosés.....	28
III.5.2.2.-Mode opératoire.....	28
III.6.-Identification des souches purifiées.....	29
III.7.-Evaluation de l'activité anticoagulante des EPS de <i>D. salina</i>	31
III.7.1.-Temps de céphaline activée (TCA).....	32

III.7.1.1.-Mode opératoire	33
III.7.2.-Temps de Quick (TQ)	33
III.7.2.1.-Mode opératoire	33

Chapitre III: Résultats et discussions

I-Characterisation physico-chimique des échantillons de l'eau du Chott Ain El Beida	35
II-Résultats d'examen microscopique des phytoplanctons observés dans la préculture.....	36
VI-Résultats d'examen microscopique des phytoplanctons issus de la purification dans un milieu solide	39
V-Activité anticoagulante des exopolysaccharides isolés de <i>Dunalleila salina</i>	42
V.1.- Temps de céphaline activé	42
V.2.- Temps de Quick	43
Conclusion.....	47
Références bibliographiques	50
Annexes.....	65

Evaluation d'activité anticoagulante d' exopolysaccharides issus de *Dunaleilla salina* isolées à partir du Chott Ain El Beida de la cuvette de Ouargla

Résumé

L'objectif de cette étude est l'isolement et identification des microalgues productrices d'exopolysaccharides à partir d'une zone humide (Chott Ain El Beida), ainsi que l'extraction de leurs exopolysaccharides et l'évaluation de leur activité anticoagulante. L'analyse physicochimiques des échantillons d'eau du Chott Ain El Beida a montré que cette dernière est qualifiée neutre et extrêmement salée.

La recherche et l'identification phénotypique des microalgues révèlent une diversité des taxons phytoplanctoniques du Chott Ain El Beida. Trois groupes ont été identifiés (Diatomées, Cyanobactéries, et Chlorophycées).

L'isolement par méthode de dilution, nous a permis de purifier deux espèces, *Navicula sp.* et *Dunaleilla salina*.

L'activité anticoagulante des extraits exopolysaccharidiques issus de *D.salina* a été également évaluée *in vitro* en utilisant les tests, temps de Quick et temps de céphaline activé. Les résultats indiquent que ces exobiopolymères sont dotés d'une activité anticoagulante relativement importante et que cette activité est dose dépendante.

Mots clés : Chott Ain El Beida, microalgues, *Dunaleilla salina*, exopolysaccharides, activité anticoagulante.

تقييم النشاط المضاد للتخثر لمتعدد السكريات الخارجي المستخلص من طحلب دوناليليا سليينا المعزول من شط عين البيضاء ورقلة

الملخص

الهدف من هذه الدراسة هو عزل والتعرف على انواع الطحالب الموجودة في الاراضي الرطبة (شط عين البيضاء)، واستخلاص متعدد السكريات الخارجي بالإضافة الى تقييم نشاطهم كمضادات لتخثر الدم. أظهر التحليل الفيزيوكيميائي لعينات ماء شط عين البيضاء أنها تعتبر معتدلة وشديدة الملوحة. البحث والتعرف عن المظهر الخارجي للطحالب كشف عن وجود مجموعة متنوعة من العوالق النباتية في شط عين البيضاء. تم تحديد ثلاث مجموعات (الدياتوم ، البكتيريا الزرقاء والطحالب الخضراء). سمح لنا العزل بطريقة التخفيف بعزل نوعين من الطحالب دوناليليا سليينا ونفيكولا. تم أيضا تقييم النشاط المضاد للتخثر لمستخلصات متعدد السكريات الخارجية المشتقة من دوناليليا سليينا في المختبر باستخدام الاختبارين زمن البروترومبين والثرومبوبلاستين النشط، تشير النتائج الى ان هذه السكريات المتعددة الخارجية ذات نشاط مضاد للتخثر بنسبة عالية يرتفع بتزايد التركيز. **الكلمات الدالة:** شط عين البيضاء، طحالب مجهرية، دوناليليا سليينا، متعدد السكريات الخارجي، نشاط مضاد للتخثر.

Evaluation of anticoagulant activity of the exopolysaccharides of *Dunaleilla salina* isolated from the Chott Ain El Beida in the aera of Ouargla

Abstract

The objective of this study is the isolation and identification of exopolysaccharide producing microalgae at the wetland level (Chott Ain El Beida), as well as the extraction of their exopolysaccharides and the evaluation of their anticoagulant activity. The physicochemical analysis of Chott Ain El Beida water samples showed that it is considered neutral and extremely salty.

Research and phenotypic identification of micoalgae reveal a diversity of phytoplankton taxa in Chott Ain El Beida. Three groups were identified (Diatoms, Cyanobacteria and Chlorophyceae) .Isolation by dilution method allowed us to purify two species, *Navicula sp.*and *Dunaleilla sailna*.

The anticoagulant activity of exopolysaccharide extracts derived from *D.salina* was also evaluated in vitro using the tests, Quick time and activated partial thromboplastin time. The results indicate that these exobiopolymers are endowed with a relatively high anticoagulant activity and that this activity is dose dependent.

Key words: Ain El Beida Chott, microalgae, *Dunaleilla sailna*, exopolysaccharids, anticoagulant activity

Introduction

Introduction

Malgré les conditions climatiques rudes, le Sahara septentrional Algérien renferme plusieurs zones humides. Ce sont des systèmes hydrologiques positifs à la fois dans l'espace et dans le temps, comparativement à leurs environnements plus secs. Ces milieux sont des écosystèmes complexes et très productifs, faisant partie des ressources précieuses sur le plan de la diversité biologique et de la productivité naturelle (KOULL *et al.*, 2016).

Les microalgues sont des organismes microscopiques, procaryotes ou eucaryotes, photosynthétiques vivant dans les mers, les océans, les eaux douces et les eaux saumâtres (GOUVETA, 2011). Elles poussent plus vite que les plantes conventionnelles, tout au long de l'année et produire le plus élevé possible rendement annuel de la biomasse (ABDELBAKI, 2013). Leur culture nécessite peu ou pas des engrais ou des pesticides et exige un minimum d'énergie à cultiver et à traiter (SADI, 2012 ; ABDELBAKI, 2013).

Ces micro-organismes unicellulaires ou multicellulaires méritent plus des études en raison de leur croissance rapide, l'atténuation directe du dioxyde de carbone et la culture sur l'année (CHANG *et al.*, 2017), jouent un rôle clé dans les écosystèmes aquatiques parce qu'elles sont en charge d'environ 40% de la photosynthèse globale (TAE PARK, 2017). Leur mécanisme photosynthétique est similaire à celui des plantes terrestres et leur transfert de l'énergie solaire en une biomasse s'avère efficace (GOUVETA, 2011).

Les premières utilisations des micro-algues datent de 2000 ans en Chine, Nostoc, une cyanobactérie, avait été utilisée comme nourriture afin de survivre à une famine (SPOLAORE *et al.*, 2006). Toujours dans un contexte de pénurie alimentaire, en 1940, les chercheurs se sont intéressés aux microalgues comme aliments pour leurs teneurs en protéines. Actuellement, elles sont ajoutées aux pâtes, aux grignotines ou aux boissons en tant que compléments nutritionnels ou colorants alimentaires naturels (BECKER, 2004).

Leur diversité en espèces et leur richesse en métabolites permettent un large panel d'applications impliquant ainsi de nombreux secteurs industriels (DEJOYE TANZI, 2013). Dans le domaine d'aquaculture, elles servent de nourriture aux stades larvaires ou juvéniles de certains animaux marins, des mollusques bivalves (huîtres, pétoncles, palourdes et

moules), des crustacés, les ormeaux et dans une moindre mesure, pour certaines espèces de poissons (GUEDES, 2012 ; MALCATA, 2012).

Les microalgues ont un intérêt stratégique en agriculture, elles sont utilisées comme fertilisants, ce qui entraîne moins de ruissellement d'azote et de phosphore que celui provenant de l'utilisation du fumier. Cela, à son tour, augmente la qualité de l'eau qui coule dans les rivières et les océans. Ces microorganismes planctoniques peuvent produire une nourriture propre et neutre en carbone et peuvent être également cultivés sur des terres abandonnées et des terres désertiques arides avec une demande minimale d'eau douce (ABDEL-RAOUF *et al.*, 2012).

En outre, les microalgues ont été décrits comme sources riches en divers composés bioactifs avec applications possibles pour l'homme dans différents domaines d'intérêt, dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique (DE MORAIS *et al.*, 2015). Des composés bioactifs dérivés de microalgues comprennent généralement divers métabolites synthétisés dans le métabolisme primaire et secondaire tels que les protéines, les acides gras, les vitamines, les pigments et les polysaccharides (XIAO et ZHENG, 2016).

La capacité des micro-algues pour produire des polysaccharides extracellulaires a été étudiée depuis le début des années 1950. Dans des conditions de stress, ces micro-organismes produisent une grande quantité d'exopolysaccharides (EPS), qui est peut-être une stratégie métabolique pour leur croissance et leur développement dans des conditions défavorables (ANGELIS *et al.*, 2012).

Contrairement aux polysaccharides de la paroi cellulaire et l'amidon intracellulaire, ces exopolysaccharides sont des structures très complexes y compris souvent jusqu'à 09 à 12 différents monosaccharides et plusieurs substituants non sucrés. Cette complexité limite les recherches sur la structure malgré l'intérêt des communautés scientifiques pour leurs activités biologiques (DELATTRE *et al.*, 2016). Seuls quelques-uns de ces polymères ont été étudiés en ce qui concerne leur composition biochimique et la structure, et encore moins est connu au sujet de la relation entre leur conformation et la structure et leurs propriétés physico-chimiques, y compris le comportement rhéologique. Ces études ont porté uniquement sur certaines espèces d'algues rouges unicellulaires marines (RAPOSO *et al.*, 2013).

Les EPS sont largement utilisés dans l'industrie alimentaire comme épaississants et additifs gélifiants (LIU *et al.*, 2016). Ils ont démontré également plusieurs activités pharmaceutiques telles que l'activité antioxydante, antitumorale, antihyperlipidémie, antimicrobactérienne et anticoagulante (TEA PARK *et al.*, 2017).

L'activité anticoagulante est parmi les plus larges activités des polysaccharides sulfatés étudiées. Les héparines non fractionnées et les héparines de bas poids moléculaire sont les seuls polysaccharides sulfatés actuellement utilisés comme médicaments anticoagulants (COSTA *et al.*, 2010). Toutefois, plusieurs effets secondaires de l'héparine ont été rapportés tels que thrombocytopénie, l'effet hémorragique et une incapacité à inhiber la thrombine de se lier à la fibrine (MANOJ SARAVANA GURU *et al.*, 2013). De plus, la majeure partie des héparines commercialisées actuellement est extraite de muqueuses intestinales de porc (ROGER, 2002). Cependant, l'utilisation des produits d'origine porcine est contradictoire avec les principes de la religion islamique. Ce qui augmente la nécessité de chercher des sources alternatives d'agents anticoagulants.

C'est dans ce contexte que s'intègre la présente étude à savoir l'exploitation de la biodiversité biologique des écosystèmes humides de la région de Ouargla, cas " Chott Ain El Beida ".

L'objectif vise l'isolement et l'identification des microalgues productrices d'EPS à partir du Chott Ain El Beida, ainsi que l'extraction de leurs EPS et l'évaluation de leur activité anticoagulante.

Le travail est organisé en trois chapitres :

Le premier chapitre est réservé à une synthèse bibliographique sur les microalgues. Elle porte sur deux aspects, le premier traite les microalgues, leurs diversité et classification et leurs modes trophique et de reproduction, le second est un aperçu sur les différents types des polysaccharides des microalgues et leurs activités biologiques.

Le deuxième chapitre décrit les techniques d'isolement, de purification et d'identification des microalgues ainsi que les protocoles suivis pour l'évaluation de l'activité anticoagulante des EPS issus de la souche modèle d'étude "*Dunaliella salina*".

Le troisième chapitre regroupe l'ensemble des résultats qui seront suivis d'une interprétation et d'une discussion.

Enfin, une conclusion générale qui portera sur une lecture attentive des différents résultats obtenus et des perspectives qui sont un ensemble de réflexions achèvent ce travail.

Chapitre I
Synthèse
bibliographique

I-Aperçu générale sur les microalgues

I.1.-Définition

Le terme «algues» désigne un ensemble d'organismes photosynthétiques, capables de convertir l'énergie lumineuse et une source de carbone (CO₂) en un ensemble de produits organiques (MIAO, 2006). Elles vivent le plus souvent dans un environnement aqueux, certaines vivent sur un support (une plante, une roche, un sol,...), d'autres sont mobiles, d'autres encore dérivent dans un milieu aqueux, certaines vivent en symbiose avec d'autres organismes (coraux, lichens,...) (MACEDO *et al.*, 2009).

Elles se distinguent des autres végétaux par leur thalle et appareil végétatif uni- ou pluricellulaire, dépourvus de racines, de tiges et de feuilles mais possédant de la chlorophylle ainsi que d'autres pigments pour réaliser la photosynthèse (BECERRA, 2009).

Les algues rassemblent à la fois les macroalgues benthiques (fixées sur un support) ainsi que des organismes microscopiques pélagiques (en eau libre, du fond à la surface), les microalgues (SIALVE et STEYER, 2013). Ces dernières, dénommées également phytoplancton, ont généralement une taille de l'ordre du micron (DIADIE, 2009). Ce sont définies comme étant des organismes unicellulaires ou pluricellulaires soit des Eucaryotes ou des Procaryotes Dans ce dernier règne, les représentants des microalgues sont regroupés dans la sous-classe des Cyanobactéries (SIALVE et STEYER, 2013).

I.2.-Diversité et classification

Les micro-algues sont très diversifiées avec 50000 à 1 million d'espèces estimées pour 30 000 caractérisées (MATA *et al.*, 2010). Les scientifiques ont analysé les microalgues pour les distinguer et les diviser en plusieurs classes selon des critères généraux comme la pigmentation, la structure biologique et le métabolisme. Les espèces sont ainsi classées en deux règnes selon leurs caractéristiques morphologiques: les eucaryotes et les procaryotes.

I.2.1.- Eucaryote

Les microalgues eucaryotes (ex: algues vertes, rouges et brunes) possèdent une structure cellulaire végétale classique compartimentée, avec ou sans paroi cellulosique, contenant au sein de son cytoplasme de nombreux organites, les chloroplastes, les

amyloplastes, les oléoplastes, les mitochondries et son noyau entouré de son enveloppe. Ces derniers sont nécessaires au bon fonctionnement des microalgues ainsi qu'à son métabolisme (RICHMOND, 2004). Aussi la membrane plasmique est une structure vivante responsable du contrôle de l'afflux et du reflux de substances dans le protoplasme (figure 01A) (TOMASELLI, 2004 ; BARSANTI et GUALTIERI, 2006).

I.2.2.-Procaryote

Les microalgues procaryotes ont une structure bactérienne classique sans compartiment, les pigments photosynthétiques sont contenus dans des membranes lamellaires. Certaines procaryotes (Cyanobactéries) possèdent des vacuoles gazeuses constituées de vésicules gazeuses, les pigments ne sont pas portés par des plastes mais sont diffus dans le cytoplasme et donnent aux cellules une coloration homogène (Figure 01B) (BARSANTI et GUALTIERI, 2014).

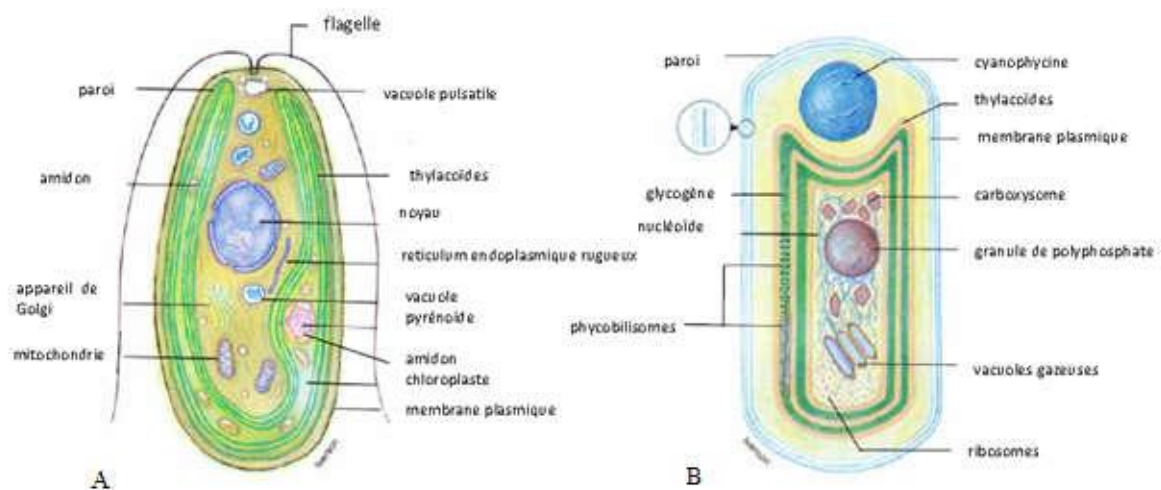


Figure 01: Structures cellulaires de microalgues unicellulaires (eucaryotes) (A) et cyanobactérie (procaryotes) (B) (PRESCOTT, 1995).

I.3.-Mode trophique des microalgues

Les microalgues sont largement et principalement connues comme étant des organismes photo-autotrophes chlorophylliens, c'est-à-dire qu'elles convertissent l'énergie lumineuse et du carbone inorganique (CO_2) en lipides et en hydrates de carbone, des formes plus condensées et stables d'énergie pour assurer leur croissance (CANTIN, 2010).

D'autre part, plusieurs espèces de microalgues ont la capacité de changer de mode trophique en fonction des variations des conditions de l'environnement où elles se développent (Tableau I). Les microalgues peuvent passer d'un métabolisme à l'autre en fonction du milieu (CHOJNACKA et MARQUEZ-ROCHA, 2004 ; PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011). Nous pouvons distinguer deux autres types trophiques en plus de celui autotrophe : l'hétérotrophe et la photo-hétérotrophie. En l'absence de lumière, les algues en mode hétérotrophe utilisent dans ce cas une source de carbone organique dans le but de substituer la fixation de CO₂ par la respiration cellulaire. Elles vont donc consommer de l'oxygène (RICHMOND, 2008 ; PITTMAN *et al.*, 2011 ; PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011). Par exemple, l'espèce *Agmenellum quadruplicatum* devient hétérotrophe en conditions de faible luminosité (VAN BAALEN *et al.*, 1970). La photo-hétérotrophie ou mixotrophie est un mixte entre la phototrophie et l'hétérotrophie. Les microalgues utilisent le carbone organique et inorganique du milieu en présence de lumière pour subvenir à leurs besoins énergétiques. Elles vont donc utiliser concomitamment la respiration cellulaire et la photosynthèse (RICHMOND, 2008 ; PITTMAN *et al.*, 2011 ; PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011).

Tableau I: Différents modes de nutrition pouvant être utilisés par les microalgues (MICHAUD, 2016).

Modes trophiques	Nutriments	Molécules générées	Voies métaboliques
Autotrophe	H ₂ O, CO ₂ et sels minéraux	O ₂ et composés organiques	Photosynthèse
Hétérotrophe	Matière organique et O ₂	H ₂ O, CO ₂ et composés organiques	Respiration
Mixotrophe	H ₂ O, CO ₂ , O ₂ , sels minéraux et matière organique	H ₂ O, CO ₂ , O ₂ et composés organiques	Photosynthèse et respiration

I.4.-Mode de reproduction des microalgues

Les algues peuvent se reproduire par multiplication végétative, c'est-à-dire par division d'une cellule seule ou d'une fragmentation d'une colonie (BARSANTI et GUALTIERI, 2006). Par exemple, une petite partie du thalle d'une algue se détache et emportée par les courants, donne plus tard un nouvel individu. Dans ce cas, cet individu est génétiquement identique à celui d'origine. C'est le mode de reproduction le plus courant chez les algues. Elles peuvent aussi libérer des spores qui germent et donne naissance à un nouvel individu.

Le mode sexuée, plus aléatoire et moins utilisée. L'individu naît cette fois de la fusion de deux cellules reproductrices mâle et femelle appelées gamètes. Les individus obtenus sont cette fois génétiquement différents, la reproduction sexuée tient compte de la variation, mais est plus coûteuse, à cause de la perte des gamètes qui échouent à s'accoupler (BARSANTI et GUALTIERI, 2006).

Le mode végétatif et asexué permet la stabilité d'un génotype adapté dans une espèce d'une génération au suivant. Les deux modes fournissent les moyens rapides et économiques d'augmenter le nombre d'individus en limitant la variabilité génétique (TOMASELLI, 2004 ; BARSANTI et GUALTIERI, 2006).

I.5.-Facteurs de production

Les facteurs ayant un rôle important sur la production microalgale sont les suivants :

I.5.1.-Energie lumineuse

La lumière affecte fortement la croissance des microalgues puisque les réactions photosynthétiques sont hautement dépendantes de l'énergie lumineuse reçue par la cellule photosynthétique (RICHMOND, 2008). Des études de ZEMKE *et al.*, (2010) montrent que les algues utilisent entre 6 et 16 photons par cellule pour réaliser la photosynthèse.

I.5.2.-Température

La température est l'un des principaux facteurs qui régulent les réponses cellulaires, morphologiques et physiologiques des microalgues, si elle est plus élevée accélèrent généralement les taux métaboliques de microalgues, c'est-à-dire augmenter la croissance des microalgues (KUMAR, 2010). Les températures généralement déclarées entre 15 et 30°C mais avec des conditions optimales entre 20 et 25 ° C (RAS, 2013).

I.5.3.-pH

La plupart des espèces de microalgues sont favorisées par un pH neutre, alors que certaines espèces tolèrent un pH plus élevé (KUMAR, 2010).

I.5.4.-Dioxyde de carbone

Le dioxyde de carbone est un élément nécessaire pour la photosynthèse. Il est généralement admis qu'un kilo de microalgues absorbe entre 1,65 et 1,8 kg de CO₂, car la biomasse de microalgues est composée de 45 % à 50 % de carbone (DOUCHA *et al.*, 2005).

I.5.5.-Nutriments

L'Azote est un élément essentiel pour la synthèse des protéines, c'est l'élément le plus important après le carbone (BECKER, 1994). Les principales sources d'Azote sont les ions Nitrate, Ammonium et l'urée, le Nitrate étant le plus utilisé dans la culture de microalgues.

Le Phosphore est un macronutriment important dans les processus de métabolisme cellulaire (CHEN *et al.*, 2011). Il est habituellement fourni sous forme d'orthophosphate et il joue un rôle important dans le transfert d'énergie et la biosynthèse des acides nucléiques dans les cellules. Le phosphore permet de réguler et réduire la toxicité des métaux par la formation des PPB (polyphosphate bodies) en maintenant des faibles niveaux cytoplasmiques de métaux (DANIEL, 1981 ; CHAMBERLAIN, 1981). Une carence en phosphore peut entraîner des accumulations de pigments chez certaines microalgues (BECKER, 1994). L'Azote et le Phosphore doivent être apportés selon un ratio N/P de 6/1.

D'autres éléments devront aussi être présents, on peut citer par exemple : silice, de potassium, de fer, de soufre, de magnésium, de métaux sous forme de traces et de vitamines.

Le Fer est un oligo-élément essentiel pour la croissance des microalgues (HU, 2004), il est important dans de nombreuses fonctions métaboliques de phytoplancton tels que le transport électronique dans le cycle de Calvin, la réduction d'ions nitrate et nitrite, la fixation de l'Azote et la synthèse de la chlorophylle.

Le Magnésium est un métal essentiel pour la croissance des algues, il est en effet un élément central de la molécule de chlorophylle. Il est impliqué dans l'agrégation des ribosomes dans les unités fonctionnelles et dans la formation de catalase (MICHAUD, 2016).

I.5.6.-Agitation

L'agitation lors de la culture des microalgues, est indispensable pour obtenir des productivités importantes de biomasse. Elle permet de mieux éclairer les cellules, de favoriser

l'apport de CO₂ en améliorant le transfert gaz-liquide et d'éliminer l'oxygène produit qui pourrait être toxique à la culture (CONVERTI *et al.*, 2009).

II- Aperçu générale sur les polysaccharides des microalgues

II.1.-Généralités

Les polysaccharides sont des polymères condensés composés de longues chaînes d'unités saccharidiques (allant de 15 à plusieurs milliers de résidus), connectées par liaison glycosidique (AUDIGIE et ZONZAIN, 1991 ; VENUGOPAL, 2011). Les polysaccharides ont une diversité structurelle importante qui varie des oligomères composés de 2 à 10 monosaccharides et à des chaînes fortement ramifiés, les polysaccharides, constitués de plus de 10 monosaccharides (FLOCH *et al.*, 2015), ils peuvent être des homo-polysaccharides qui sont constitués d'un seul type de monosaccharide, tels que le cellulose et le glycogène, qui sont des polymères de glucose ou des hétéro-polysaccharides contenant deux genres ou plus de sucre ou sucre modifié, par exemple l'héparine, qui est constituée de l'acide α -L-iduronique-2-O-sulfate (90% de ses composants) et D-glucosamine-N-sulfate, 6-O-sulfate (10% de ces composants) (YANG et ZHANG, 2009). Il est le plus largement utilisé cliniquement comme anticoagulant et antithrombotique (SOUZA *et al.*, 2015).

Les polysaccharides ont été identifiés chez une multitude d'organismes allant des bactéries, aux animaux en passant par les plantes supérieures, les champignons, les micro et macroalgues.

II.2.-Différentes types des polysaccharides des microalgues

Plusieurs espèces de microalgues, y compris les cyanobactéries synthétisent de grandes quantités de polysaccharides qui sont dans leurs boues ou sont libérés dans les milieux de croissance, le type et la quantité de polysaccharides produits dépendent des espèces et des conditions de culture (VENUGOPAL, 2011). Si on s'intéresse aux polysaccharides algaux il est nécessaire de prendre conscience que leur variabilité structurale est en partie liée à leurs fonctions biologiques. Ils peuvent être qualifiés en polysaccharides

fibrillaires qui participe à la formation de la paroi des cellules, des polysaccharide de réserve et des EPS (VILLAY, 2013).

II.2.1.-Polysaccharides fibrillaires

Les polysaccharides fibrillaires sont généralement de nature cellulosique et/ou hémicellulosique, qui sont des polymères de glucose liés en β -(1,4) ou β -(1,3), et dans certaines espèces de xylose ou de mannose (KORNPROBST, 2005).

II.2.2.-Polysaccharides de réserve

Le polysaccharide de réserve des microalgues est l'amidon, constitué d'amylose et d'amylopectine. L'amylose représente 20% à 30% de l'amidon, glucane linéaire de 60 à 6000 unités de glucose liée en α -(1,4). L'amylopectine représente environ 75% de l'amidon, elle est formé de 6000 à 600000 unités de glucose liée en α -(1,4) et ramifié toutes les 12 unités en α -(1,6) (AUDIGIE et ZONSZAIN, 1991).

La structure des molécules de réserve diffère d'une microalgues à une autre. Les Rhodophytes ont un amidon floridéen de grande taille : 100-200 MDa, alors que les Chlorophyceae (algues verts) ont un amidon plus petit : 150-750 kDa et les Phaeophyceae (algues brunes) ont un très petit oside de réserve de 2-6 kDa (KORNPROBST, 2005).

II. 2.3.-Exopolysaccharides

Le terme "exopolysaccharide" (EPS) ou "polysaccharide exocellulaire" a été proposé par SUTHERLAND (1972) et CERNING (1994) comme appellation générale pour ce groupe. Les EPS sont des biopolymères à poids moléculaire élevé qui mettent en commun une composante importante des polymères extracellulaires entourant la membrane des microorganismes dans le milieu aquatique (TRABELSI, 2016). En effet, les microorganismes peuvent excréter deux types d'EPS, il peut être soit excrété dans le milieu environnant, soit reste lié à la surface de la cellule sous forme de capsule (BERGMAIER, 2002).

De nombreux micro-algues, en particulier une variété d'algues rouges et les cyanobactéries, sont des producteurs de EPS structurellement différents (LIU *et al.*,2016). Ces composés hydrophiles et polyanioniques forment une gangue, retiennent l'eau et piègent

les cations permettant ainsi au microalgue de résister à la dessiccation (FEUGA, 1997). Ils peuvent servir de puits d'énergie et de carbone répondant au stress. Ils promouvoir aussi la formation d'agrégats d'algues, d'immobiliser des cellules à proximité immédiate dans une matrice, initier l'adhésion cellulaire à un substrat, favoriser la motilité glisse le long du substrat (PARKER, 2013).

Par rapport à d'autres producteurs microbiens, les microalgues synthétisent d'EPS avec une plus grande diversité de monomères de sucre dans la même macromolécule (FREITAS, 2017), seul l'EPS de *Gyrodinium impudicum* est constitué d'un homopolymère de galactose (RAPOSO *et al.*, 2013 ; XIAO et ZHENG, 2016).

Il existe souvent des substituants organiques et inorganiques dans la composition des EPS affectant leurs propriétés physiques et biologiques (XIAO et ZHENG, 2016). La présence d'acides uroniques et des résidus de sulfate est très fréquent chez les EPS algales, ce qui contribue encore à leurs propriétés distinctives (FREITAS, 2017).

II.3.-Activités biologiques des EPS

Les EPS des microalgues ont souvent été décrits comme porteurs d'activités biologiques. L'activité biologique de ces biopolymères dépend de leurs caractéristiques structurales telles que le degré de sulfatation, le poids moléculaire, le type de sucre et la ramification glycosidique (SUN, 2009 ; ANGELIS, 2012).

II.3.1.-Activité antivirale

De nombreuses études ont mis en évidence que les polysaccharides libérés par certaines micro-algues marines présentent une activité antivirale contre différents types de virus, soit de mammifères ou autre (RAPOSO *et al.*, 2013), en inhibant leurs répliquions dans les premières phases du cycle ou leurs attachement aux cellules hôtes, ou de même en inhibant la pénétration des particules virales dans des cellules hôtes (HAYASHI *et al.*, 1996). Par exemple, les polysaccharides synthétisés par *Arthrospira platensis*, inhibent la répliquion de plusieurs virus *in vitro* en inhibant la pénétration du virus dans différentes cellules hôtes (RAPOSO *et al.*, 2013). RADONIC *et al.* (2010), ont montré que les polysaccharides libérés par *A. Platensis* et *Porphiridium purpureuma* ont une activité antivirale *in vitro* et *in vivo* contre deux souches de vacciniavirus et un éctromélievirus. Egalement, YIM (2004), a démontré que les polysaccharides extracellulaires sulfatés p-KG03

issus de microalgue marine *Gyrodinium impudicum* KG03 ont un pouvoir inhibiteur *in vitro* contre le virus de l'encéphalomyocardite. LEE *et al.* (2006), ont détecté que l'EPS de *Navicula directa* sont efficaces contre un large spectre de virus enveloppés (HSV 1, HSV 2, IFV-A et VIH), en inhibant l'interaction virus-cellule, par blocage de l'attachement du virus sur la cellule hôte et la pénétration dans la cellule hôte.

II.3.2.-Activité antioxydante

Les antioxydants sont des composés capables de réduire les radicaux libres et de prévenir l'oxydation des molécules sensibles à l'oxydation tels que les lipides ou les acides aminés (KLEIN *et al.*, 2012). Les polysaccharides sulfatés libérés par les micro-algues marines ont également la capacité d'empêcher l'accumulation des radicaux libres et des espèces chimiques réactives et par conséquent agissant comme agents antioxydants protecteurs contre le stress oxydatif (LIU *et al.*, 2016).

Les polysaccharides sulfatés de *Porphyridium* ont présenté une activité antioxydante contre l'auto-oxydation de l'acide linoléique et a inhibé les lésions oxydatives des cellules 3T3 (fibroblastes issus d'embryons murins), éventuellement en piégeant les radicaux libres (LIU *et al.*, 2016). En outre, CHEN *et al.* (2010) ; ont constaté que les différents échantillons des polysaccharides sulfatés de *Rhodella Reticulata* avaient une capacité contre le piégeage des radicaux d'anion superoxyde deux fois plus forte que celle de l' α -tocophérol. Il semble que la teneur en acide uronique, la structure et la conformation des EPS influencent les propriétés antiradicalaires et la capacité antioxydante (SUN *et al.*, 2009).

II.3.3.-Activité anti inflammatoire et immunomodulateur

La réaction inflammatoire est un mode de réponse de l'organisme à une agression de type infectieuse, immunologique, tumorale,... etc. Cette réaction est souvent bénéfique mais il arrive parfois qu'elle endommage les cellules et les tissus (RIOUX, 2010). Les composés qui sont capables d'interagir avec le système immunitaire pour réguler positivement ou réguler négativement les aspects spécifiques de la réponse de l'hôte peuvent être classés comme des immunomodulateurs ou des modificateurs de la réponse biologique (TZIANABOS, 2000).

Les polysaccharides immunomodulateurs sont capables de stimuler simultanément les différentes composantes de système immunitaire. Ce qui leur confère différentes

propriétés thérapeutique, notamment des propriétés antitumorales et antiinflammatoires (SANCHEZ, 2006). Les polysaccharides de bas poids moléculaire sont plus efficaces que celles de hauts poids moléculaires à l'amélioration de l'immunité (SUN, 2009).

Plusieurs espèces des microalgues (*Chlorella stigmatophora*, *C. autotrophica*, *C. vulgaris*, *Dunaleilla tertiolecta*, *D. salina*, *Porphyridium sp.*, et *Phaeodactylum sp.*) sont de bonnes sources de polysaccharides immunorégulateurs qui jouent un rôle vital dans les fonctions immunitaires du corps et les processus inflammatoires (XIAO et ZHENG, 2016). L'effet stimulateur des EPS de *Phaeodactylum tricorutum* sur les cellules immunitaires a été mis en évidence par l'activité phagocytaire positive étudiée soit *in vitro* ou *in vivo*. Alors que l'extrait polysaccharidique sulfaté issu de *C.stigmatophora* ont montré des effets immunodépresseurs (GUZMAN *et al.*, 2003). Aussi, le polysaccharide sulfaté p-KG03 du dinoflagellé marin *G. impudicum* active la production d'oxyde nitrique et stimule la production de cytokines dans les macrophages (BAE *et al.*, 2006). L'inhibition de la migration des leucocytes semble être lié à l'activité anti-inflammatoire des polysaccharides, mais les mouvement leucocytaire vers le site de la lésion contribue à la libération supplémentaires de cytokines et la production d'oxyde nitrique, la thérapeutique doit être efficace contre cette inflammation (MTSUI *et al.*, 2003). Les EPS de diatomées en particulier EPS sulfatés ont de multiples activités biologiques y compris l'activité anti-inflammatoires. *Phaeodactylum tricorutum* est la diatomée la plus étudié, ses EPS ont démontré des propriétés anti-inflammatoires contre l'œdème de la patte induit par la carragénine avec $IC_{50}=2,92$ mg/ kg, par rapport à l'anti-inflammatoire indométhacine avec une $IC_{50}= 8,50$ mg/ kg (GUZMAN *et al.*, 2003).

II.3.4.-Activité anticoagulante et antithrombotique

L'effet anticoagulant est défini comme l'inhibition de la formation de thrombine active dans le plasma, alors que l'effet antithrombotique est défini comme l'inhibition de la formation de la thrombose et/ou de sa croissance (COLLIEC *et al.*, 1990). Quatre classes de polysaccharides sulfatés (Héparine, Dermatane-sulfate, chondroïtine sulfate fucosylé et fucoïdane des algues) ont toutes une activité anticoagulante, due à leur interaction avec les enzymes et les inhibiteurs du système de la coagulation. Leurs effets anticoagulants dépendent de l'endroit de la substitution sulfurique. Une petite modification dans la structure conduit à une perte presque complète de l'activité anticoagulante (MULLOY *et al.*, 2000).

Il existe plusieurs études sur les anticoagulants isolées de macroalgues, mais seulement quelques références sur les microalgues (RAPOSO *et al.*, 2015), tel que les EPS sulfatés de *Arthrospira platensis* qui agit comme antithrombogène, antiathérogène et anticoagulant (LIU *et al.*, 2016 ; RUOCCO, 2016).

D'une part, il a été déclaré que l'activité anticoagulante des polysaccharides est associée à la forte teneur en polysaccharides sulfatés. D'autre part, HASUIET *et al.*(1995) n'ont trouvé aucune activité anticoagulante dans le polysaccharide de *Cochlodinium polykrikoides* , malgré que le degré de sulfatation du polysaccharide est de 7% à 8%. Ceci suggère que les propriétés anticoagulantes des polysaccharides ne dépendent pas seulement du pourcentage de résidus sulfate, mais la plupart du temps sur la distribution et la position des groupes sulfate et probablement la configuration des chaînes de polymère (GINZBERG et KORIN, 2008 ; PEREIRA *et al.*, 2002).

la fonction anticoagulante et l'activité antivirale pourrait entrer en conflit, car l'activité antivirale peut ne pas avoir besoin degré élevé de sulfatation (FABREGAS *et al.*, 1999). En outre, certains soins devraient être pris pour éviter les accidents vaso-cérébrale hémorragiques lorsque les EPS sont utilisés comme des agents anti-thrombotique pour briser le caillot (XIAO et ZHENG, 2016).

III- Présentation du modèle d'étude

III.1.-Généralités sur *Dunaliella salina*

D. salina est une micro-algue unicellulaire, appartenant à la classe des Chlorophycées. En générale verte (couleur des pigments chlorophylliens), mais peut être apparaitre rouge-orangée dans certaines conditions en raison de la présence abondante de β -carotène (qui est un pigment accessoire, pouvant représenter 10% du poids sec de l'algue). C'est une micro-algue halophile, qui se développe spontanément et préférentiellement dans les milieux lagunaires très salés (BOROWITZKA *et al.*, 1990). Elle est l'un des organismes eucaryote les plus tolérants aux conditions environnementales extrêmes. Elle peut supporter des salinités massiques allant de 3% à la saturation en NaCl, des pH de 5,5 à 11 et des températures comprises entre 0 et 40 °C (GINZBURG, 1987 ; MISHRA *et al.*, 2008). Dans ces gammes de conditions, *D. salina* est en suspension mobile. Peu d'organismes sont capables de survivre dans des conditions avec de telles concentrations de sel. Pour survivre, *D. salina* produit des quantités élevées en β -carotène qui lui permet de se protéger de

l'intensité lumineuse mais également des hautes concentrations en glycérol qui lui confère une protection contre les chocs osmotiques (KIM *et al.*, 2017).

III.2.-Description morphologique

Cette microalgue verte halophile présente des cellules sphériques, ovoïdes ou pyriformes et des tailles variées autour de 5 à 25 µm de longueur et 3 à 13 µm de largeur (POLLE *et al.*, 2009). Mobile, possède deux flagelles d'égale longueur et dispose d'un unique chloroplaste cupuliforme pourvu d'un pyrénioïde central. La paroi cellulosique est absente, cependant les cellules sont recouvertes d'une fine membrane plasmique vraisemblablement de nature glycoprotéique mucilagineuse appelée glycocalyx (TEODORESCO, 1905 ; BOROWITZKA, 1988, AVRON et BEN-AMOTZ, 1992 ; OREN, 2005). Cette absence de paroi rigide facilite probablement son polymorphisme, permet un changement rapide de volume de cellule pour l'adaptation aux variations de pressions osmotiques. A contrario, cette caractéristique ne facilite pas la culture et la récolte de l'algue. L'algue étant très sensible aux forces de cisaillement, durant sa production (BOROWITZKA, 1991).

III.3.-Taxonomie

D. salina est une microalgue unicellulaire dont la classification fut proposée pour la première fois en 1905 par TEODORESCO (OREN, 2005). Selon GONZALEZ *et al.* (2009), c'est une espèce du ;

Domaine : Eukaryota,

Règne : Plantae,

Division : Chlorophyta,

Classe : Chlorophyceae,

Ordre : Chlamydomonadales,

Famille : Dunaliellaceae,

Genre : Dunaliella,

Espèce : *Dunaliella salina*.

Il faut noter qu'à l'intérieur du genre *Dunaliella* qui comprend aujourd'hui 28 espèces, il est parfois très difficile de différencier ces dernières, son organisation taxonomique basée sur caractéristiques morphologiques et physiologiques qui dépend à conditions de croissance .

III.4.-Reproduction

La prolifération des microalgues s'effectue principalement par reproduction asexuée ou multiplication végétative : une cellule mère se divise alors en deux cellules filles génétiquement identiques. Cependant, comme la majorité des eucaryotes, les microalgues peuvent aussi se multiplier par reproduction sexuée (COLEMAN et PRÖSCHOLD, 2005).

D. salina présente une reproduction sexuée de type hétérothallique et isogamique avec différentes phases du cycle de vie identifiées et présentées sur la (figure 02) (OREN, 2005).

D. salina et certaines des autres espèces subissent des cycles de vie complexes qui englobent, en plus de la division des cellules végétatives mobiles, la possibilité d'une reproduction sexuée (OREN, 2005). Deux cellules mobiles indifférenciées ou gamètes (haploïdes) fusionnent par l'apex grâce à l'émission d'un tube reproducteur pour former le planozygote. Cette cellule diploïde tétraflagellée produit une paroi résistante et perd ses flagelles pour donner le zygote. Par germination, le zygote se divise en 4 à 8 cellules, plus rarement de 16 à 32, libérées par rupture de la paroi. La taille interviendrait dans la compétence des cellules à réaliser la reproduction sexuée. En effet, lorsque la taille des cellules végétatives est réduite, il existe un stade Palmellae intermédiaire avant la reproduction (MONTROYA et OLIVERA 1993, BOROWITZKA et SIVA, 2007). Les cellules se présentent alors dépourvues de flagelles et agglomérées au sein d'une matrice mucilagineuse.

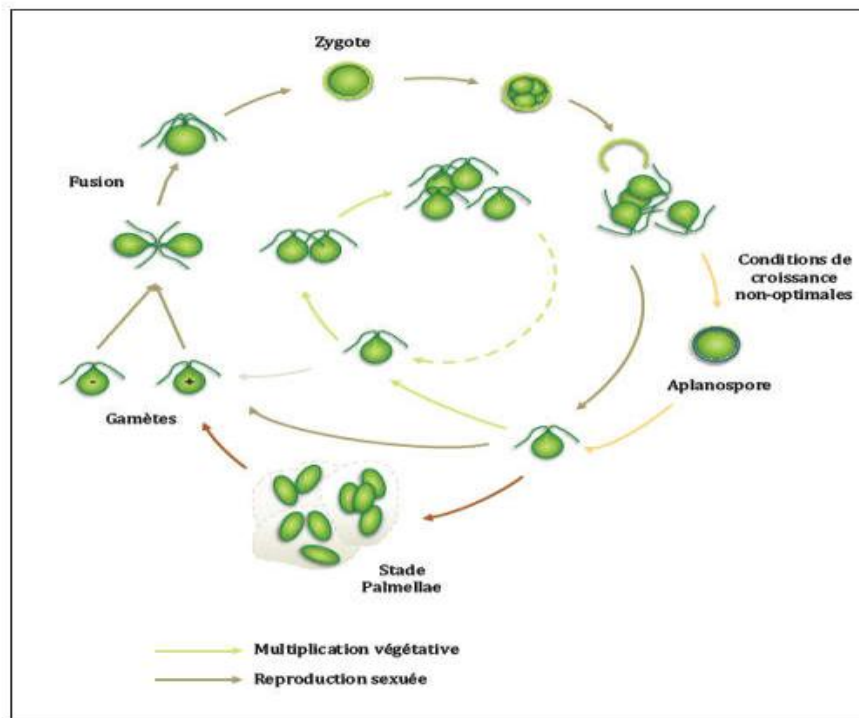


Figure 02: Représentation schématique des différents stades du cycle de vie de l'espèce *Dunaliella salina* (MYRIAM, 2013).

Chapitre II
Matériel et Méthodes

I-Présentation de la région d'étude

La région de Ouargla est une des plus grandes oasis du Sahara algérien située à 800km au Sud-est du pays, à 32°de latitude nord et 5°20' de longitude ouest et s'étend sur une superficie de 99000 km.

Elle est limitée au Nord par les wilayas de Djelfa, Biskra et El-Oued, à l'Est par la Tunisie, au Sud par les wilayas de Tamanrasset et d'Ilizi et à l'Ouest par la wilaya de Ghardaïa (Figure 03).

D'un point de vue climatique, la ville de Ouargla est caractérisée par un climat de type saharien. L'aridité est importante. Elle se manifeste par des températures élevées en été, des précipitations très faibles et surtout par une forte évaporation due à la sécheresse de l'air.

La température moyenne selon l'O.N.M. (2007), est d'environ 23,48°C avec 34,70°C en juillet pour le mois le plus chaud et 11,86°C en Janvier pour le mois le plus froid. Les précipitations sont très réduits et irrégulière à travers les saisons et les années. Leur répartition est marqué par une sécheresse presque absolue de mois de Mai jusqu'au mois d'Aout les précipitations moyennes annuelles sont de l'ordre de 3,03 mm avec un maximum de 7 mm, pour le mois de Janvier (O.N.M, 2007).

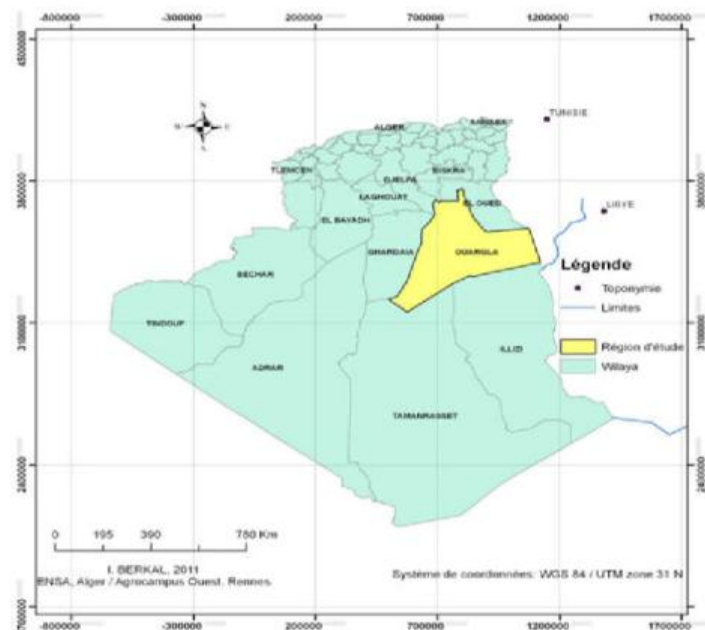


Figure 3: Délimitation de la cuvette de Ouargla

I.1.-Chott Ain El-Beida

Le chott Ain El-Beida est une dépression saline d'une surface totale de (442.63ha), située au milieu des palmeraies de la cuvette de Ouargla (loin de 5 km)(longitude 5° 22' 42" à 5° 21' 52" Est et latitude 31° 57' 30" à 31° 59' 02" Nord). Il est compris entre la palmeraie de Ouargla à l'Ouest et au Sud et la palmeraie d'Ain El-Beida à l'Est (T.A.D, 2002). Allongé en direction Nord- ouest, Sud- est sur une longueur de 5,3 Km (photo 01) (D.G.F, 2004).

Le Chott constitue le point bas de la ville de Ouargla. Actuellement, l'alimentation en eau du Chott se fait à partir de la nappe phréatique dont le niveau varie en fonction de la saison et des actions de l'Homme (drainage de la palmeraie, irrigation), et surtout à partir de la divagation des eaux usées déversées dans le Chott (MEYTHIAZ, 2003).

Selon la direction générale des forêts (2004), le site constitue une zone humide bordée de formations végétale halotolérantes, herbacées, forestières, et buissonnantes représentées par des formations arborées dégradées et par des buissons épars. Le chott d'Ain El Beida situe sur la voie de migration des populations d'oiseaux migrateurs des régions Eurasiatique et Africaine, le chott abrite plusieurs espèces d'oiseaux d'eau, tant sédentaires que migratrices, et des espèces de mammifères peu étudiées et par conséquent peu connues.



Photo 01 : Chott Ain El Beida

II-Principe d'étude

La région de Ouargla recèle d'importants biotopes humides tels que les chotts Ain El-Beida et Oum Raneb...etc. Pour les scientifiques, ces zones sont des écosystèmes complexes et très productifs, faisant partie des ressources précieuses sur le plan de la diversité biologique et de la productivité naturelle.

Vue l'importance des zones humides sahariennes comme véritables réserves d'êtres vivants capables de s'adapter à des conditions extrêmes, nous avons choisi ces biotopes comme un modèle-clé d'habitat pour évaluer et surveiller la biodiversité des microalgues, indispensable pour sa préservation.

La présente étude a porté sur l'isolement et l'identification des microalgues productrices d'exopolysaccharides à partir du Chott Ain El Beida, ainsi que l'extraction de leurs exopolysaccharides et l'évaluation de leur activité anticoagulante.

III-Méthodologie de travail

III.1.-Récolte des échantillons

Durant l'année 2018, nous avons réalisé deux campagnes de prélèvement, dont la première période était au 12 avril et la deuxième au 26 Avril. L'échantillonnage se fait à la journée entre (09 h-10 h).

L'échantillonnage a été réalisé à l'aide d'un filet à plancton de 60 μm de vide de maille muni d'un collecteur (Figure 04). L'opération consiste à filtrer l'eau à 20 cm en dessous de surface de l'eau.

Il est indispensable de multiplier les prélèvements partiels (03 répétitions) puis de les mélanger pour obtenir un échantillon moyen représentatif d'eau à analyser.

Les échantillons prélevés sont mis dans des flacons en verre stériles étiquetés de date de prélèvement et transportés au laboratoire dans une glacière à température ambiante pour être analysé immédiatement.

Une préfiltration des échantillons lors de la collecte est généralement efficace pour éliminer les organismes indésirables (copépodes, rotifères, ciliés), qui peuvent manger ou autrement tuer les algues (ANDERSON et KAWASH, 2005).

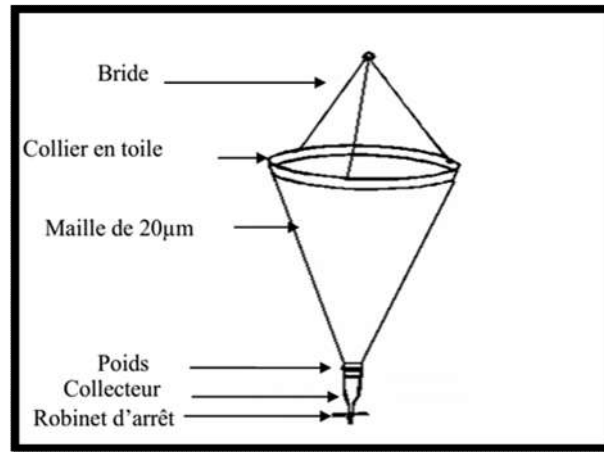


Figure 04: Schéma d'un filet à plancton.

III.2.-Analyses physico-chimiques des échantillons

A la différence d'autres matériels biologiques marins, le peuplement de phytoplancton est étroitement lié au volume d'eau dans lequel il se développe et avec lequel il se déplace.

Pour apprécier l'impact de la qualité des eaux des sites d'échantillonnage sur la potentialité microalgale, il est primordial de mesurer les paramètres physico-chimiques sur le même volume d'eau échantillonné (TREYTURE *et al.*, 2010).

Le potentiel hydrogène (pH), température et la conductivité électrique (CE) des échantillons d'eau prélevés ont été mesurés dans le laboratoire à l'aide d'un pH-mètre, thermomètre et conductivimètre.

III.3.-Examen microscopiques des échantillons

Pour confirmer la présence des microalgues dans les échantillons récoltés, il est important de procéder à la détermination directe des espèces récoltées par observation sous microscope optique.

Chaque échantillon a été soigneusement homogénéisée, une goutte d'eau a été prélevée à l'aide d'une micropipette, puis mise entre lame et lamelle et examinée au microscope optique à des grossissements appropriés et par un balayage de toute la surface de la lamelle.

Il est conseillé de parcourir tout d'abord la lame à un faible grossissement (X 10) pour obtenir rapidement une vue d'ensemble et on agrandit progressivement le grossissement jusqu'à (X100).

III.4.-Préparation de la préculture

La préculture est longtemps été utilisée comme une étape préliminaire pour l'isolement des algues unicellulaires. Les échantillons naturels sont souvent déficients en un ou plusieurs nutriments, mais dans la nature les algues survivent, parce que l'action bactérienne, le pâturage, et la mort d'organismes recyclent les nutriments.

Une fois que l'échantillon est recueilli, le recyclage peut être réduit ou modifié et un stress nutritionnel peut causer la mort de l'espèce cible. Ainsi, pour certaines espèces, un faible enrichissement d'échantillon peut prolonger la vie des cellules algales en bon état nécessaire pour l'isolement (ANDERSON et KAWASH, 2005) et par conséquent, une mise en culture préalable peut augmenter la concentration des cellules et améliorer leur qualité (BLANCHETON, 1985).

III.4.1.-Mode opératoire

Au laboratoire, des volumes de 500 ml d'échantillons d'eau prélevés sont mis en précultures dans des flacons stériles de 1000 ml et afin de maintenir dans les mêmes conditions de croissance naturelle d'intensité lumineuse et de température, les échantillons sont incubés près d'une source de lumière « fenêtre » et à température ambiante (25°C), pendant 10 jours. Après cette durée d'incubation, les cellules algales devraient être en phase exponentielle de croissance avec un bon potentiel de multiplication et la concentration cellulaire devrait être suffisante pour qu'elle soit utilisée comme inoculum.

L'agitation se fait manuellement deux fois par jour et l'enrichissement se fait par l'ajout d'un volume constant de 10 ml d'eau provenant du chott Ain El Beida préalablement stérilisé par autoclavage à 120 °C pendant 20 min.

Pour contrôler la croissance des cellules algales, les précultures sont examinées chaque deux jours par observation microscopique.

III.5.-Isolement et purification des souches

III.5.1.-Isolement des souches par dilution

L'isolement des cellules algales permet d'obtenir des cultures monospécifiques (unialgales). Trois méthodes sont généralement utilisées, isolement en milieu liquide,

isolement sur milieu solides et isolement par dilution. Cette dernière technique consiste à isoler les cellules par une succession de dilutions. C'est une méthode simple et rapide qui donne de bons résultats (BLANCHETON, 1985).

La technique de dilution décrite par BELCHER et SWALE (1982) et HOFF et SNELL (1987), a été suivie pour l'isolement des microalgues.

III.5.1.1.-Mode opératoire

Dans une série de six tubes à essais contenant chacun 9 ml de l'eau échantillonnée stérile, on ajoute un volume de 1 ml de la suspension algale prélevé à partir de la préculture et à l'aide d'une pipette stérile. Puis on agite soigneusement les tubes et les étiquette (cette suspension est définie comme la dilution 10^{-1}) (Figure 05).

Cinq tubes de cette suspension sont mis à incuber dans le laboratoire. Tandis que, la suspension algale du premier tube est partagé entre les six tubes de dilution suivante 10^{-2} contenant chacun 9 ml de l'eau échantillonnée stérile à raison de 1ml par tube. On effectue cinq répétitions pour chaque série de dilution.

Cette étape de dilution est répétée pour les autres dilutions (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} et 10^{-7}), chaque fois avec 1 ml de la suspension précédente et un 9 ml de l'eau échantillonnée stérile.

Le repiquage s'effectue dans la zone stérile autour de la flamme d'un bec de Bunsen et de façon la plus aseptique possible.

Les tubes sont ensuite bouchés avec du coton cardé et sont incubés dans le laboratoire à température ambiante à côté de la fenêtre où ils sont éclairés par la lumière du soleil. Au cours de l'incubation, les tubes sont agités manuellement deux fois par jour.

Des examens microscopiques sont effectués après deux semaines d'incubation, puis après quatre semaines, par prélèvement d'un petit volume de manière aseptique à partir de chaque tube.

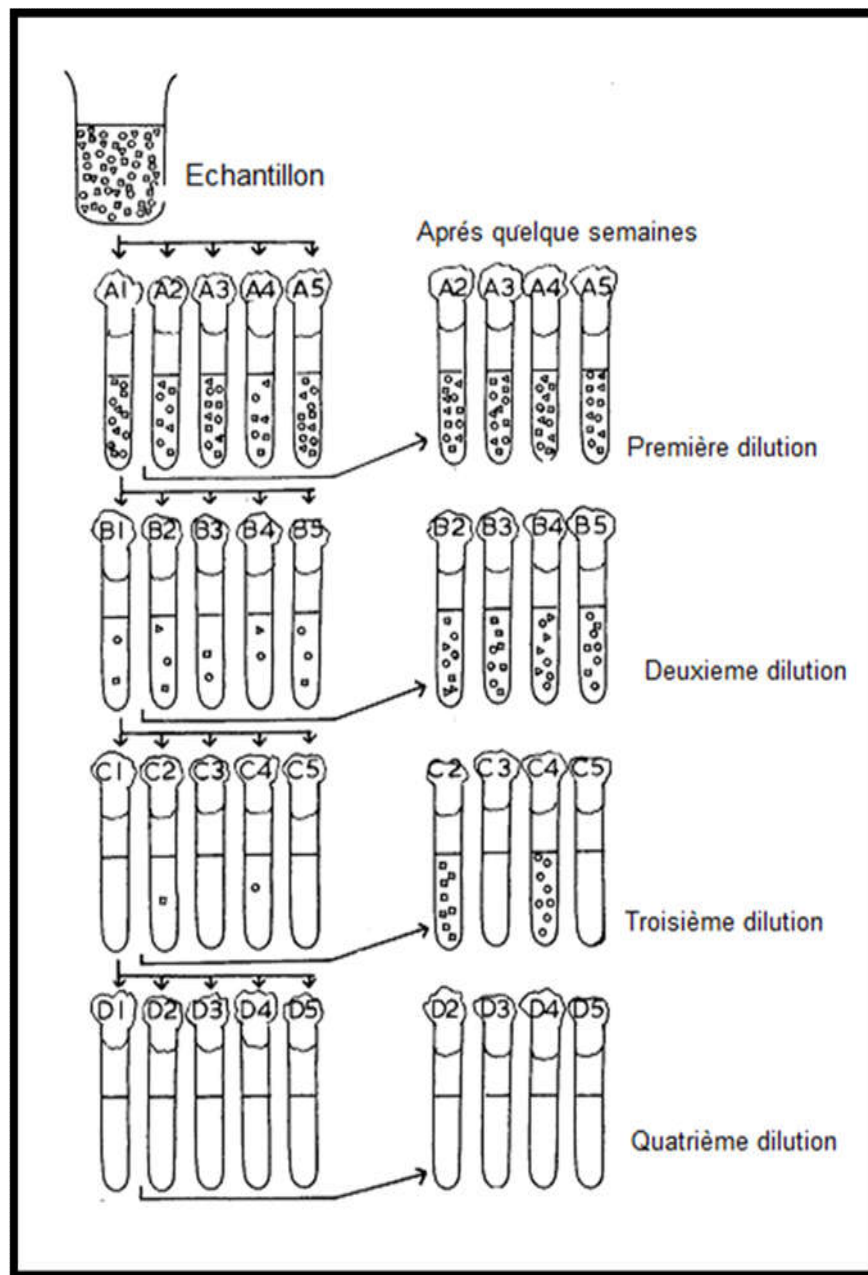


Figure 05: Préparation des cultures unialgales par dilution (BELCHER et SWALE, 1982)

III.5.2.-Purification par repiquages successifs dans un milieu solide

La purification a pour objectif d'obtenir une culture d'une seule espèce, libre de toutes les autres espèces (GUILLARD, 2005). La purification sur des plaques d'agar est probablement la plus ancienne et la plus utilisée, mais elle n'est efficace que pour les algues qui peuvent se développer sur la surface d'agar (GUILLARD, 2005).

III.5.2.1.-Préparation des milieux solides gélosés

Pour préparer un litre de milieu de culture solide, 15 g d'agar sont ajoutés à un litre d'eau prélevée de site d'échantillonnage. Le mélange gélosé est ensuite stérilisé dans un autoclave pendant 15 min sous une pression de 150 bars et température de 120 °C.

Après refroidissement, environ 20 ml de milieu encore liquide sont coulés dans des boîtes de Pétri, au voisinage immédiat d'une flamme de bec Bunsen, afin de conserver un environnement stérile.

Une fois le milieu gélosé est solidifié, les boîtes peuvent être utilisées immédiatement (BARBEROUSSE, 2006).

III.5.2.2.-Mode opératoire

Après 2 semaines d'incubation, quand les micro-organismes commencent à se développer dans les tubes à essais. A l'aide d'une anse de platine stérile on prélevait une goutte à partir de chaque dilution et l'ensemencer sur un milieu solide gélosé.

L'incubation des boîtes de pétri est réalisée dans le phytotron durant 7 jours, à une température de 25± 1°C et à un régime de lumière continue assuré par 3 lampes blanches fluorescentes de 18 W.

Dès l'apparition du développement des colonies, on prélève à nouveau quelques cellules qu'on étale sur une nouvelle boîte de pétri. L'opération est répétée plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'une souche pure. Toutes ces manipulations s'effectuent au voisinage d'une flamme de bec Bunsen afin d'éviter les risques de contaminations.

III.6.-Identification des souches purifiées

L'identification micromorphologique est essentielle pour l'identification du genre. L'étude repose sur l'observation de leurs caractères morphologiques à l'aide d'un microscope photonique en utilisant différents grossissements. Elle a été réalisée sur des prélèvements issus du pré culture, des différentes dilutions d'isolement et des milieux solides de purification.

Cette identification micromorphologique a été réalisée selon la même procédure citée précédemment dans l'examen microscopique. Cependant, pour les prélèvements issus des milieux solides, une étape supplémentaire est nécessaire, consiste à place les colonies prélevées à la pointe d'une pipette pasteur stérile dans un volume de 2 ml l'eau de culture stérile pendant 1 à 2 h afin de faciliter le détachement des micro-organismes, en vue d'effectuer une observation primaire des populations dans leur état naturel.

Des solutions de Lugol et du Bleu de méthylène sont communément utilisées pour mettre en évidence des caractères utiles à l'identification (BERBEROUSSE, 2006).

Les identifications sont basées sur des critères taxonomiques établis par BOURRELLY (1990) et (1985), CARMELO (1997) et HOFF et SNELL (1987).

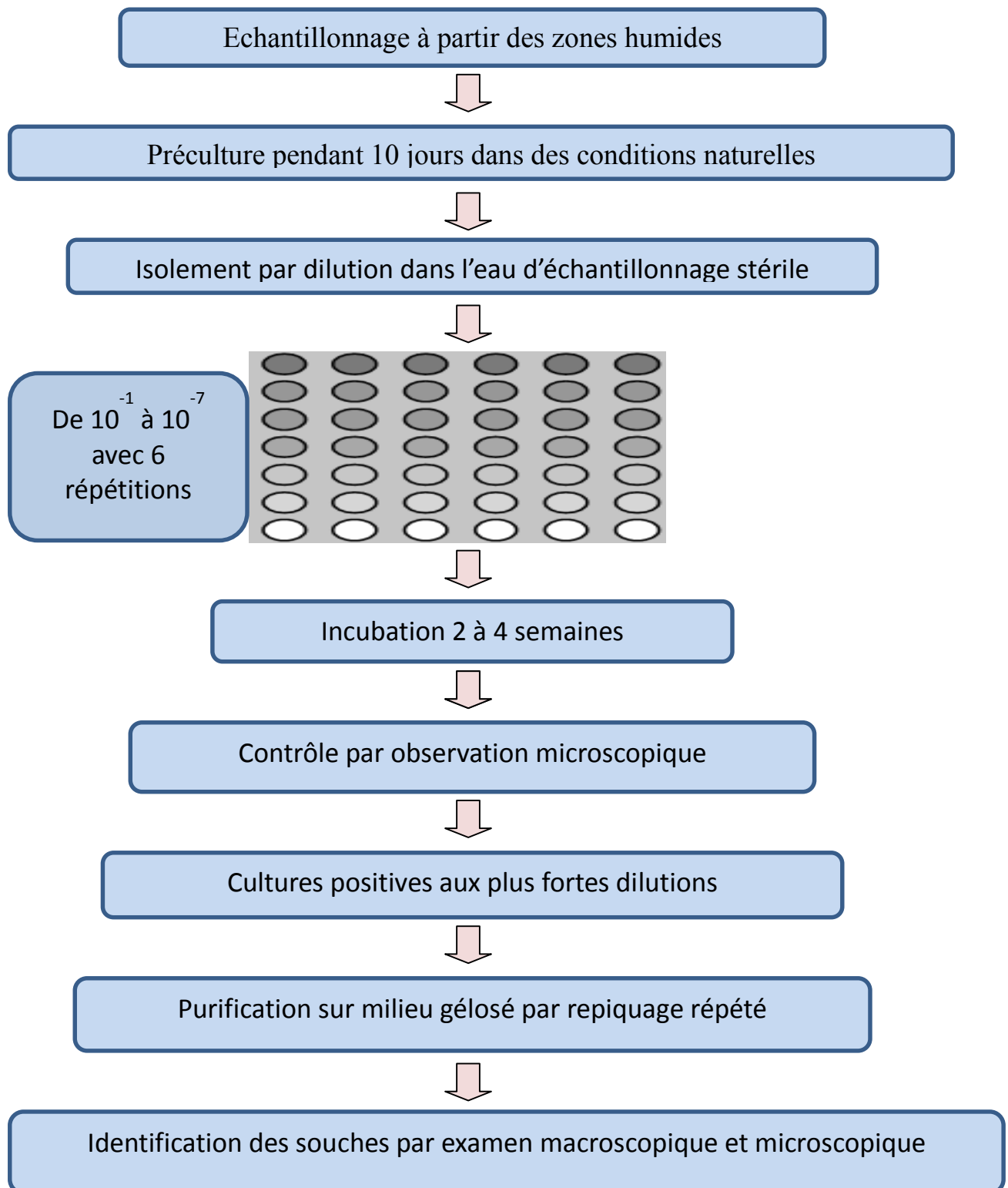


Figure 06: Représentation schématique des étapes d'isolement et purification des microalgues.

III.7.-Evaluation de l'activité anticoagulante des EPS de *D. salina*

L'extrait exopolysaccharidique issu de *D. salina* utilisée pour réaliser nos travaux a été obtenue en collaboration avec l'Université Clermont Auvergne (Institut Pascal).

La coagulation correspond à une cascade de réactions enzymatiques aboutissant à la transformation par la thrombine du fibrinogène soluble en fibrine insoluble qui constitue l'armature du caillot. Ces réactions enzymatiques sont des protéolyses limitées qui convertissent des pro-enzymes en enzymes. Ce phénomène est localisé et régulé par un ensemble d'inhibiteurs physiologiques. Les dérèglements de ce système exposent à un risque de thrombose ou à un risque hémorragique (RICHARD, 2013).

Il existe deux voies d'activation de la coagulation, qui en pratique sont plus ou moins imbriquées:

- La voie endogène ou intrinsèque ne faisant intervenir que des facteurs plasmatiques, dont le premier est activé au contact du sous endothélium vasculaire,
- La voie exogène ou extrinsèque nécessitant le passage dans le sang d'un facteur tissulaire, libéré par la destruction des cellules endothéliales suite à une brèche (PONCELET, 2012).

L'activité anticoagulante des exopolysaccharides issus de *D. salina* est évaluée *in vitro* par détermination des temps de céphaline activé (TCA) et temps de Quick (TQ) et à l'aide d'un coagulomètre Thrombotimer type 2-channel.

- TCA c'est un test de la voie intrinsèque (indication des facteurs VIII, IX, XI et XII).
- TQ c'est un test de la voie extrinsèque (indication des facteurs V, VII et X, II).

Ils sont déterminés en utilisant du plasma humain pauvre en plaquette. Le sang des sujets sains adultes de 25 à 45 ans est prélevé par ponction veineuse dans un tube en plastique sur une solution anticoagulante citrate trisodique (3,8%) et à raison de 1 volume pour 9 volumes du sang.

Le sang est ensuite centrifugé à 2400 rpm pendant 20 min pour obtenir un plasma pauvre en plaquettes. Le plasma citraté recueilli est conservé à basse température (- 80 °C) jusqu'à son utilisation (ZHANG *et al.*, 2010).

Les héparines constituent un véritable standard de l'arsenal antithrombotique. Ce sont les premiers anticoagulants naturels à avoir été découverts. Ils sont utilisés depuis plus de 70 ans (ELALAMY, 2010). Pour cette raison, le sodium héparine (50 mg/ml) est utilisé comme contrôle positif.

Préparation des dilutions d'extrait exopolysaccharidique

Une solution mère d'EPS de 10 mg/ml est préparée dans l'eau distillée soit une concentration de 1% (YOON *et al.*, 2002).

Une série de dilutions est préparée à partir de cette solution mère comme indique dans le tableau II.

Tableau II:- Méthode de dilution de l'extrait exopolysaccharidique.

Dilution	1	1/2	1/4	1/8
Solution EPS (µl)	10	10	10	10
Eau distillée (µl)	0	10	10	10
Concentration (µg/ µl)	10	5	2.5	1.25

III.7.1.-Temps de céphaline activée (TCA)

Le réactif BIO-CK (TCA) est un test de coagulation simple qui explore l'ensemble des facteurs de coagulation de la voie intrinsèque (facteurs XII, XI, IX, VIII, X, V, II et I) à l'exception des plaquettes. Ce réactif permet la recalcification du plasma en présence d'une quantité standardisée de céphaline (phospholipide qui remplace les plaquettes) et d'un activateur du facteur XII (Kaolin). Le kaolin présente le double avantage d'une lecture aisée et d'un temps de lecture plus court (STRUVER et BITTNER, 1962 ; TIETZ, 2006).

Chez l'adulte, la valeur normale moyenne du TCA est de 30 à 34sec habituellement. Un laboratoire doit donc toujours rendre un temps témoin pour permettre l'interprétation du test.

III.7.1.1.-Mode opératoire

La procédure suivie dans la réalisation de ce test est celle pratiquée par BIOLABO, (2012). Un volume de 10µl d'extrait expolysaccharidique de différentes concentrations est ajouté à 90µl de plasma humain normal, puis on ajoute 100µl du réactif céphaline kaolin. Le mélange est incubé pendant 5 min à 37°C. Après l'addition de 100 µl de CaCl₂ (0,025mM) pour une recalcification du plasma, le temps de céphaline kaolin activé est mesuré à l'aide d'un coagulomètre. Les résultats sont exprimés par le temps de coagulation en seconde (WANG *et al.*, 2013).

III.7.2.-Temps de Quick (TQ)

Le temps de Quick (TQ) est un paramètre biologique explorant l'activité anticoagulante des facteurs I, II, V, VII et X (voie extrinsèque et voie finale commune) (RACHLINE, 2012). Il correspond au temps mis par un plasma citraté pour coaguler en présence de thromboplastine calcique, réactif jouant un rôle d'activateur tissulaire de la coagulation (RACHLINE, 2012).

III.7.2.1.-Mode opératoire

Un volume de 10 µl des dilutions des expolysaccharidiques est ajouté à 90 µl de plasma normal. Le mélange est incubé à 37°C pendant 5 min. La réaction est déclenchée par l'addition de 200 µl de thromboplastine et le temps de coagulation est mesuré à l'aide d'un coagulomètre (YOON *et al.*, 2002).

Le temps de Quick ainsi mesuré pourra être converti en Taux de Prothrombine (TP) ou en International Normalized Ratio (INR). L'expression INR est à réserver aux surveillances des traitements AVK (CAQUET, 2004).

Où $INR = (\text{Temps de Quick de l'échantillon} / \text{Temps de Quick du contrôle négatif})$

Chapitre III

Résultats et discussions

I- Caractérisation physico-chimique des échantillons de l'eau du Chott Ain El Beida

Les données de la caractérisation physico chimique de l'eau du Chott Ain El Beida sont regroupées dans le tableau III.

Tableau III: Paramètres physico-chimique des échantillons de l'eau du Chott Ain El Beida

Paramètre	pH	CE mS/ cm	T °C
Moyenne ± ER	07.28± 0.38	94.73± 28.41	22.10± 1.04

Les microalgues ont une grande faculté d'adaptation à divers environnements, leur croissance dépende des paramètres tels que la salinité, le pH, l'oxygène dissous, l'intensité lumineuse et la disponibilité des nutriments (HIRANO et *al.*, 1997).

L'eau du Chott Ain El Beida est qualifié neutre (pH 7.28± 0.38), extrêmement salée (CE= 94.73± 28.41 mS/ cm) et à une température estimée à 22.10± 1.04 °C (tableau III), proche à la température optimale pour la croissance des microalgues dont se situent entre 21 et 26 °C (BECERRA, 2009).

La conductivité électrique est très élevée ce qui implique la charge de la solution en éléments minéraux, pourrait être expliqué par la forte évaporation en absence de toute précipitation, favorise l'élévation de la salinité. En effet, la région d'étude (Ouargla) caractérisée par un climat de type saharien. L'aridité est importante, la température moyenne annuelle pour la période allant de 2010 à 2015, est d'environ 24°C, avec 36.68°C en Juillet pour le mois le plus chaud et 12.22°C en Janvier pour le mois le plus froid (ONM). Selon HACINI (2011), la salinité varie considérablement dans le Chott Ain El Beida, de 58,3 g/l en mois de Décembre à 283,15 g/l en mois de Mai.

Les paramètres physico-chimiques influent directement sur les microorganismes de l'eau et particulièrement sur la diversité des microalgues. ALLEN et al. (1968), montrent que le développement des algues Eucaryotes est inhibé à 35°C. D'autre part, le nombre et la variété des Cyanophycées sont plus importants à 35 qu'à 25°C. Par ailleurs, BROCK (1973), rapporte qu'un pH inférieur à 05 inhibe la vie et la croissance des phytoplanctons.

II-Résultats d'examen microscopique des phytoplanctons observés dans lapréculture

L'observation micromorphologique des prélèvements issus de la préculture, nous a permis d'identifier deux genres (*Navicula sp.*, *Nitzschia sp.*) appartiennent au groupe de Diatomées (tableau IV), deux genres (*Phormidium granulatum*, *Spirulina sp.*)appartiennent au groupe de Cyanobactéries (tableauV) et qu'une seule espèce (*D. sailna*) appartient au groupe de Chlorophycées (Tableau VI).

Tableau IV: Diatomées observées dans la préculture.




Espèces	Photos
<p style="text-align: center;">Non identifiée</p>	
<p><i>Navicula sp. (a)</i> (HASLE <i>et al.</i>,1996) Règne : Chromista Phylum : Bacillariophyta Classe: Bacillariophyceae Ordre: Naviculales Famille: Naviculaceae Genre : <i>Navicula</i></p>	
<p><i>Nitzschia sp. (b)</i> (HARTLEY <i>et al.</i>,1996) Règne : Chromista Phylum : Heterokonta Classe: Bacillariophyceae Ordre: Bacillariales Famille: Bacillariaceae Genre : <i>Nitzschia</i></p>	

Tableau V: Cyanobactéries observées dans la préculture.




Espèces	Potos
<p><i>Phormidium granulatum</i> (KUETZING et GOMONT, 1893).</p> <p>Règne: Bacteria,</p> <p>Phylum: Cyanobacteria,</p> <p>Classe : Cyanophyceae,</p> <p>Ordre : Oscillatoriales,</p> <p>Famille : Phormidiaceae,</p> <p>Genre : <i>Phormidium</i>,</p> <p>Espèce : <i>Phormidium granulatum</i>.</p>	
<p><i>Spirulina sp.</i> (GOMONT, 1893).</p> <p>Régne : Bacteria,</p> <p>Phylum : Cyanobacteria,</p> <p>Classe: Cyanophyceae,</p> <p>Ordre : Crococcales,</p> <p>Famille : Spirulinaceae,</p> <p>Genre : <i>Spirulina</i>,</p>	

Tableau VI: Chlorophycées observées dans la préculture

Espèces	Photos
<p><i>Dunaleilla salina</i> (GONZALEZ et al., 2009). Règne : Plantae,</p> <p>Division : Chlorophyta,</p> <p>Classe : Chlorophyceae,</p> <p>Ordre : Chlamydomonadales,</p> <p>Famille : Dunaliellaceae,</p> <p>Genre : <i>Dunaliella</i>,</p> <p>Espèces : <i>Dunaliella salina</i></p>	

III-Résultats d'examen microscopique des phytoplanctons observés dans les dilutions

Les résultats de l'observation microscopique effectuée sur les prélèvements issus des différentes dilutions de (10^{-1} jusqu'à 10^{-7}) sont consignés dans les photos 02 et 03. On remarque que les dilutions croissantes en commencent à partir de 10^{-4} contiennent généralement une seule espèce. Excepté, la dilution de 10^{-7} qui ne montre aucune croissance des phytoplanctons.

Ces examens microscopiques indiquent une diversité des phytoplanctons conduisent à la détermination des deux espèces, (*Navicula sp.*) appartenant au groupe des Diatomées et (*Dunaleilla salina*) appartenant au groupe des Chlorophycées. BABOUSMAIL (2015), a détecté la présence de *D. salina* dans le Chott Ain El Beida.

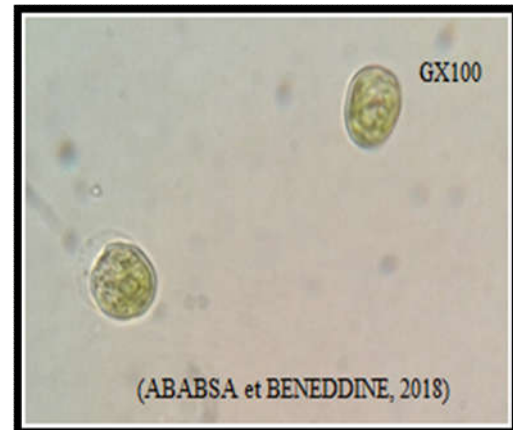
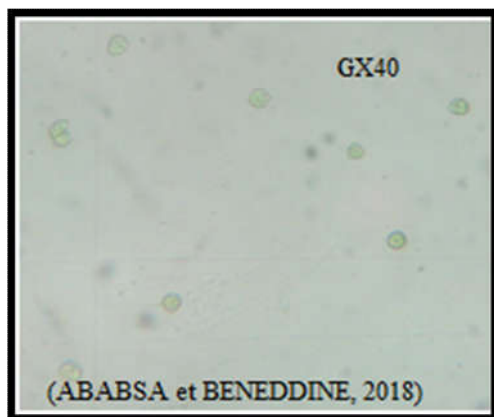


Photo 02: Identification micromorphologique des chlorophycées (*Dunaleilla salina*)

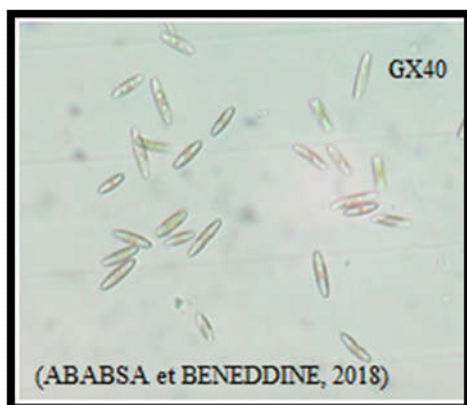


Photo 03: Identification micromorphologique des Diatomées (*Navicula sp.*)

VI-Résultats d'examen microscopique des phytoplanctons issus de la purification dans un milieu solide

L'observation des colonies obtenues par repiquages successifs dans un milieu solide, nous a permis de déterminer la couleur des colonies observées (marron et vert). Les colonies sont généralement de formes rondes et de différentes tailles.

Les colonies des diatomées ont été reconnues par leur aspect morphologique caractéristique. Elles apparaissent visqueuses, de couleur marron, de taille de quelques millimètres, adhérent à la gélose et sont difficiles à mettre en suspension.

Alors que, celles des algues vertes sont de couleur verte, de taille inférieure à celle de diatomées, non adhérent à la gélose et facile à mettre en suspension.

L'identification des microalgues repose sur l'étude de plusieurs caractères morphologiques (forme, couleur, la présence des flagelles et leur nombre,...) (HOFF et SNELL,1987). En se basant sur ces critères d'identification et les résultats d'examen microscopique, les microalgues purifiées sont *D. salina* et *Navicula sp.*

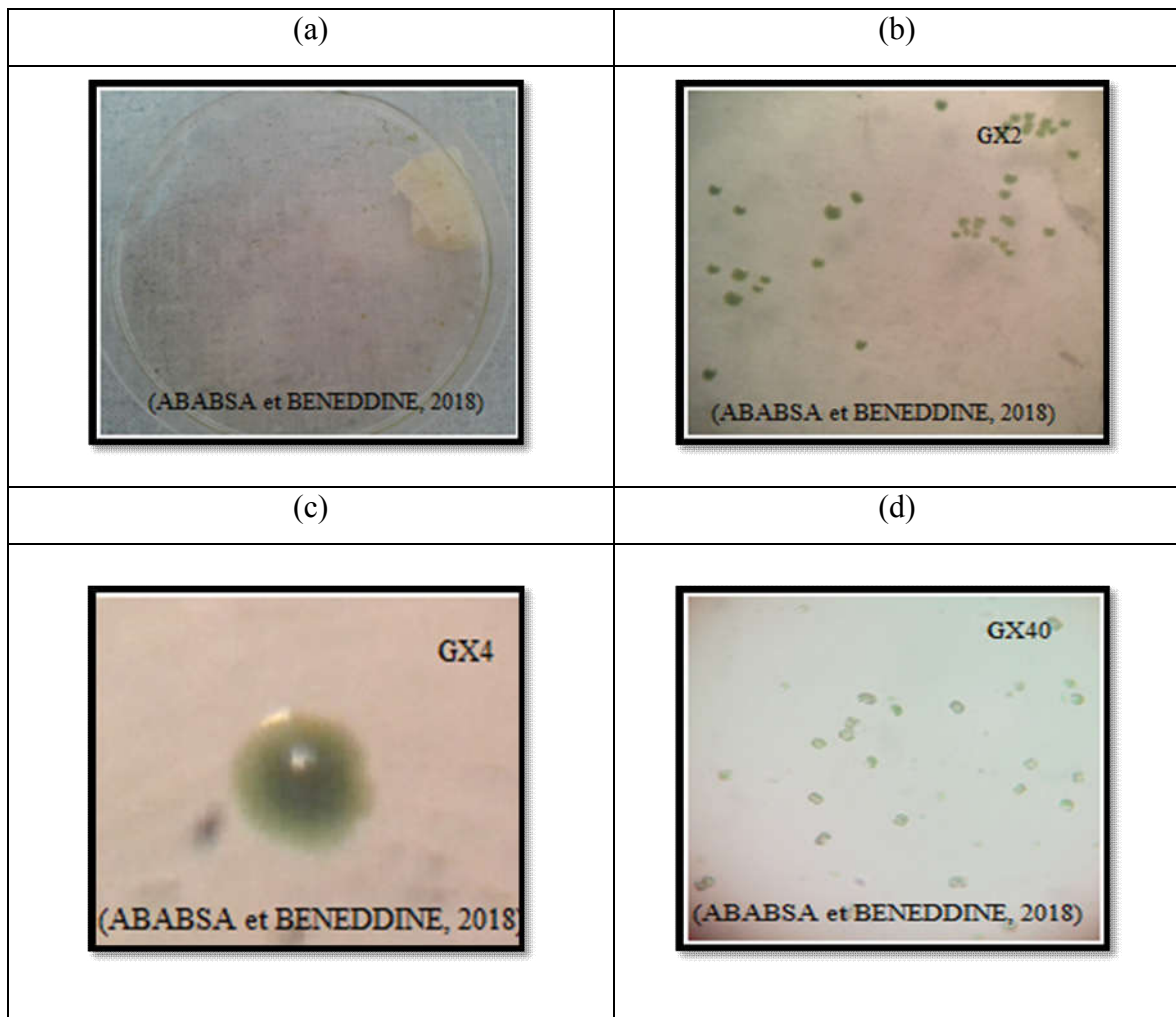


Photo 04: Observations macroscopique (a) et microscopiques (b, c et d) des colonies de *D. salina*

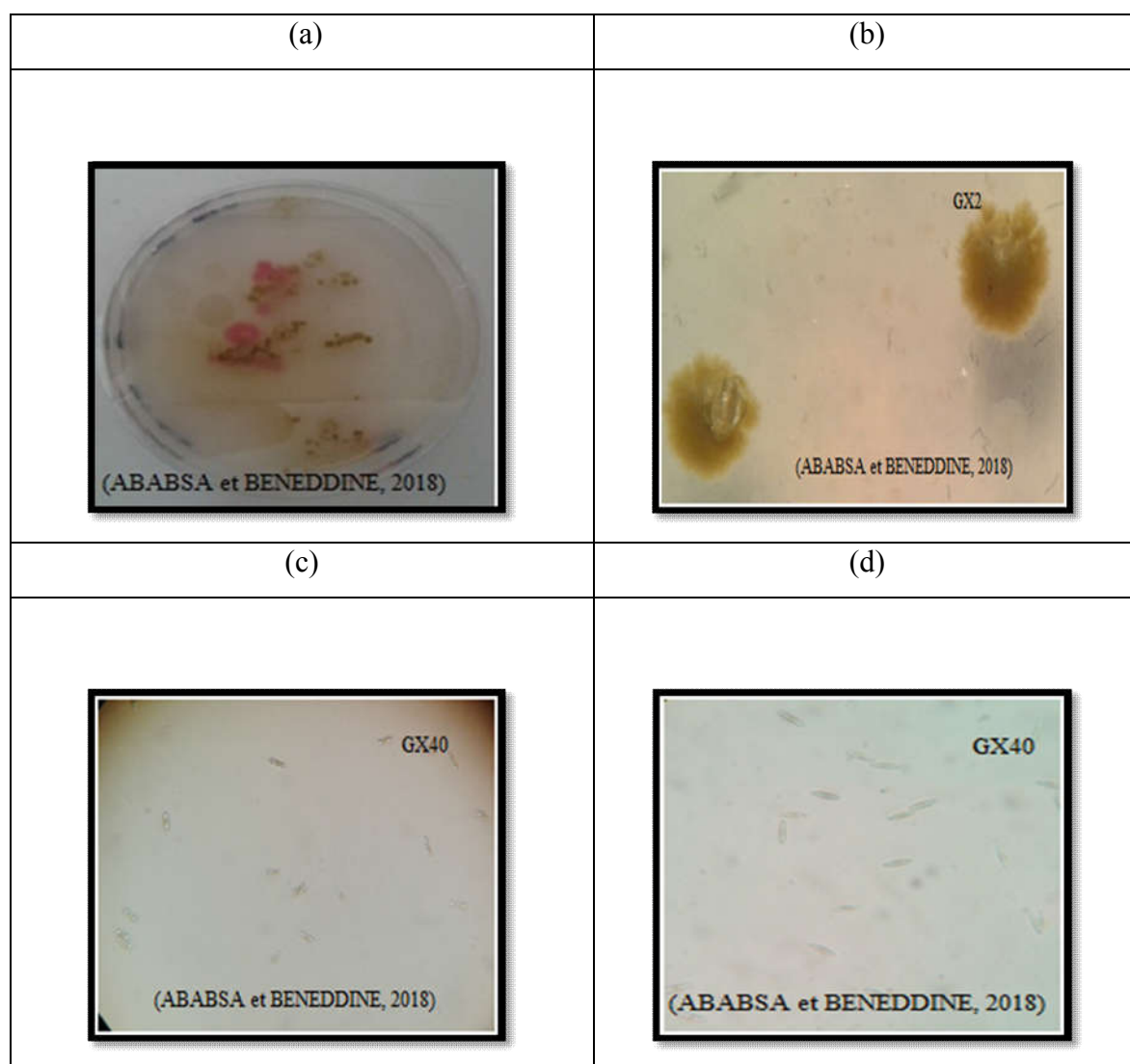


Photo 05: Observations macroscopique (a) et microscopiques (b, c et d) des colonies de *Navicula sp.*

V-Activité anticoagulante des exopolysaccharides isolés de *Dunalleila salina*

V.1.- Temps de céphaline activé

La figure 07 illustre la capacité anticoagulante de l'extrait exopolysaccharidique issu de *D. salina* évaluée via le temps de céphaline activé (TCA).

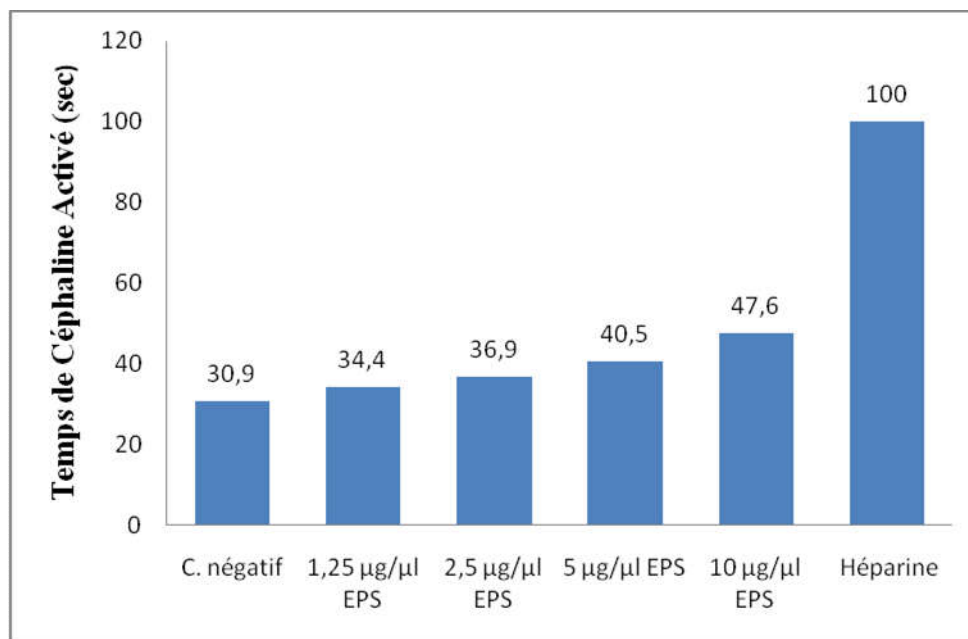


Figure 7: Capacité anticoagulante exprimée en temps de céphaline activé (TCA) des EPS issus de *D.salina*.

Les temps de TCA enregistrés révèlent que l'extrait exopolysaccharidiques à une capacité anticoagulante dose dépendante. Les valeurs de TCA notées sont de plus en plus augmentées au fur et à mesure que les concentrations en exopolysaccharides augmentent. Toutefois, restent inférieures comparativement à celle enregistrée en présence d'une concentration de 50 mg/ ml d'héparine (TCA supérieur à 100 sec).

Il est important de noter que la plus grande concentration de l'extrait exopolysaccharidiques (10 µg/µl) a montré une activité anticoagulante estimée à 47.6 sec, avec un rapport de 1.54 fois plus que celle de contrôle négatif (30.9 sec), soit un temps d'allongement de 16.7 sec.

D'après KARAKI et al. (2013), un composé présente une activité anticoagulante lorsque le rapport de TCA de l'échantillon/ TCA de contrôle négatif est supérieur à 1,2. L'allongement de TCA en présence des exobiopolymères indique que ces derniers sont

capables d'inhiber les facteurs de la voie endogène et /ou les facteurs communs entre les deux voies de la coagulation (ZHANG et al., 2008).

Cette prolongation indique un effet inhibiteur de ces exopolysaccharides sur l'activité de la thrombine et de la polymérisation de la fibrine, corrobore les résultats de SYNYTSYA et al. (2015), ont rapporté que les polysaccharides sulfatés, Ulvane et Dextrane issus de *Capsosiphon fulvescen* retardent le temps de coagulation de manière dose dépendante pour le temps de céphaline activé. Aussi, MAGALHAES et al. (2011), ont marqué que l'hétérofucanede la fraction F1.5v, polysaccharides sulfatés issus d'une macroalgue *Dictyopteris delicatula*, à une concentration 0,40 mg/ml de plasma a provoqué un prolongement de TCA 3,8 fois par rapport au Clexane (un anticoagulant commercial de référence). De même, KARAKI et al. (2013), ayant étudié l'activité anticoagulante des polysaccharides isolés à partir de l'algue brune *Dictyopteris polypodioides* via le temps de TCA, ont trouvé que pour une concentration de 5µg/ 100 ml de plasma les fractions polysaccharidiques, FL (Fucoïdane + Laminarane), FLM (Fucoïdane + Laminarane + Mannuronane), M (Mannuronane) expriment des temps de TCA de l'ordre de 40.8 sec, 43.4 sec et 42.2 sec avec un rapport de 1.45, 1.55, et 1.44 respectivement.

Divers polysaccharides sulfatés anticoagulants ont été isolés des algues marines. Deux, "fucoïdane sulfatés" isolé des algues marine brunes (*Ascophyllum nodosum*) et "carraghénane" isolé des algues marines rouges (*Gigartina skottsbergii*) sont identifiés à hautes activité anticoagulante, similaire ou supérieure à celle de l'héparine (NGO, 2009). Ces composés sont les plus dotées des activités anticoagulantes grâce à la présence du groupement hydroxyle (-OH) dans leurs structures chimiques, ainsi en subissant des modifications de type carboxylation ou sulfatation en synergie peuvent provoquer l'inhibition de la voie endogène de la coagulation (MANALLAH, 2011).

V.2.- Temps de Quick

La capacité anticoagulante de l'extrait exopolysaccharidiques isolés de *D. salina* via la voie exogène, temps de quick (TQ) est consignée dans la figure 08.

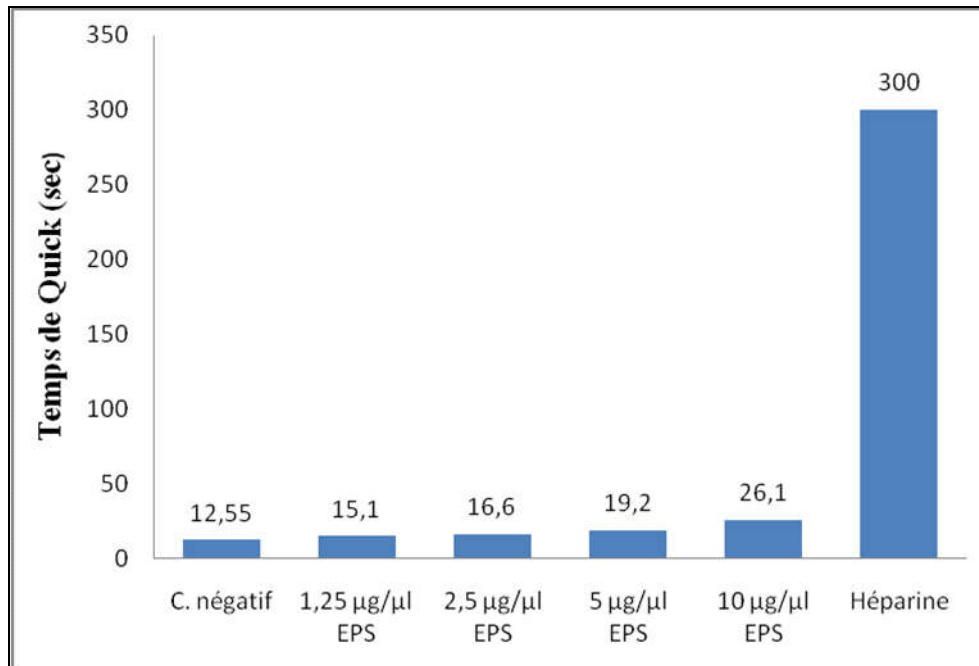


Figure 08: Capacité anticoagulante exprimée en temps de Quick (TQ) des EPS issus de *D.salina*.

Les dilutions croissantes de l'extrait exopolysacchariques montrent des temps de TQ différents, varient de 15 sec pour la concentration de 1.25 µg/µl à 26 sec pour celle de 10 µg/µl, jugés importantes que la valeur normale (12,5 sec). Mais, restes faiblement importantes que celle de l'héparine, contrôle positif (300 sec).

MAGALHAES et al. (2011), rapportent que les hétérofucanes issus des macroalgues *Dictyopteris delicatula*, ne montre aucun pouvoir anticoagulant *vis-à-vis* la voie exogène. IRHIMEH et al. (2009), ont constaté que le fucoïdane isolé de l'algue brune *Undaria pinnatifida*, à des faibles concentrations (allant de 7,8 à 63 mg/ l) ne possèdent aucun effet anticoagulant estimé *in vitro* à travers le TQ et qu'il augmente avec l'augmentation de ses concentrations à 125 mg/ l, il est de l'ordre de 120,1 sec à la concentration de 1000 mg/l.

L'action anticoagulante des exopolysaccharides et polysaccharides isolés des algues se produit principalement en inhibant la sérine protéase, protéine clé de la coagulation, la thrombine et le facteur Xa. Ceci est facilité par l'accélération de l'activité de l'inhibiteur de la sérine protéase, inhibiteur physiologique antithrombine-serpine III (AT-III). Il y a moins d'inhibition dans le cas de IXa, XIa, XIIa et kallikréine. Un cofacteur II (HC-II) a été identifié qui inhibe exclusivement la thrombine, mais n'a pas d'activité significative contre la coagulation ou d'autres protéases fibrinolytique. Les propriétés anti-hémostatiques d'héparine

et d'autres polysaccharides sulfatés vont au-delà de l'activité anticoagulante et comprennent la potentialisation fibrinolytique et les effets anti-lipémiques (SHANMUGAM et MODY , 2000 ; ABD EL BAKY, 2013).

D'autre part, l'activité anticoagulante des polysaccharides d'algues vertes a affecté la voie commune principalement l'action anticoagulante médiée par HC-II. Des recherches ont été menées en utilisant des substrats chromogènes pour les majeures enzymes de coagulation, le facteur Xa et la thrombine. Ces enzymes sont inhibées indirectement par le SPS des algues, *via* la potentialisation de l'activité des inhibiteurs de la sérine protéase AT-III et HC-II. L'inhibition de la thrombine par HC-II a été potentialisée par ces polysaccharides (ABD EL BAKY, 2013).

Dans ce travail, il a été démontré pour la première fois que les EPS de *D. salina* montrent une activité anticoagulante. Cette activité peut être due à la présence des groupes sulfates. En fait, la teneur en sulfate de monosaccharides des algues influence l'activité anticoagulante (LI et al., 2008). NGO (2013), admis que la propriété anticoagulation des polysaccharides est en rapport avec le modèle de sulfatation permettant une interaction avec des protéines cibles de la cascade de coagulation.

Conclusion

Conclusion

La présente étude a porté sur l'isolement et l'identification des microalgues productrices d'EPS à partir du Chott Ain El Beida, ainsi que l'extraction de leurs EPS et l'évaluation de leur activité anticoagulante.

Les analyses physicochimiques de l'eau du Chott Ain El Beida ont montré que cette dernière est qualifiée neutre et extrêmement salée, avec un pH de l'ordre de 7.28 ± 0.38 , à une température de 22.10 ± 1.04 °C, favorable pour le développement de plusieurs espèces des microalgues et à une conductivité électrique estimée à 94.73 ± 28.41 mS/ cm.

La recherche et l'identification phénotypique des microalgues révèlent une diversité des taxons phytoplanctoniques du Chott ain El Beida. Au total 05 genres microalgals sont identifiés, *Navicula sp.*, *Nitzschia sp.*, appartiennent au groupe de Diatomées, *Phormidium granulatum*, *Spirulina sp.*, appartiennent au groupe de Cyanobactéries et une espèce, *Dunaleilla salina* appartient au groupe de Chlorophycées.

Le suivi de l'isolement par méthode de dilution, nous a permis de purifier deux espèces, *Navicula sp* et *D. salina*. Cette dernière Chlorophycée halotolérante, développe des mécanismes d'adaptation face au stress salin, impliquant l'accumulation de plusieurs métabolites, tels que le β -carotène, le glycérol et les EPS.

L'activité anticoagulante des EPS issus de *D.salina* mesurée par le temps de céphaline activé et le temps de quick montre que ces exobiopolymères sont doués d'une activité anticoagulante relativement importante et que cette activité est dose dépendante.

Notre travail reste préliminaire et vu son originalité, il serait intéressant de poursuivre par d'autres études sur :

La biodiversité des microalgues dans l'espace et dans le temps.

L'optimisation des conditions de production de ces EPS .

L'évaluation des autres activités biologiques, antidiabétique, anti-inflammatoire, anticancéreuse...

L'analyse structurale de ces EPS par chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse GC/MS, et par la résonance magnétique nucléaire RMN pour établir une relation structure- activité.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

1. **ABD EL BAKY H., EL-BAROTY G., 2013-** Healthy Benefit of Microalgal Bioactive Substances. Journal of Aquatic Science Vol. 1, No. 1, 11-23
2. **ABDEL-RAOUF N., AL-HOMAIDAN A. A., IBRAHEEM I. B. M.,2012-** Agricultural importance of algae. African Journal of Biotechnology, Vol 11(54). 11648-11658p.
3. **ALLEN M., STANIER R., 1968-** Selective isolation of blue-green algae from water and soil. J. Gen. MicrobioZ., 51 : 203.209.
4. **ANDERSEN A., KAWACHI M., 2005-** Traditional Microalgae Isolation *in* **ANDERSEN A.,** Algal Culturing Techniques. Elsevier Academic Press.USA. 83-100 p.
5. **ANGELIS S., NOVAK A., SYDNEY B., SOCCOL T., CARVALHO C., PANDEY A., NOSEDA D., THOLOZAN L., LORQUIN J., SOCCOL R. 2012-** Co-culture of microalgae, cyanobacteria, and macromycetes for exopolysaccharides production: Process preliminary optimization and partial characterization. Appl. Biochem. Biotechnol. 167, 1092–1106.
6. **AUDIGIE C., ZONSZAIN F., 1991-**Biochimie structurale.ED.Doin.266p.
7. **AVRON M., BEN-AMOTZ A., 1992-** *Dunaliella: physiology, biochemistry, and biotechnology*. 1edition. CRC Press, Boca Raton, FL. 256 p.
8. **BABAOUSMAIL M., 2014-** Identification des algues du Sahara septentrional: L'effet des algues sur le stress salin (cas de la région de Ouargla.Mémoire Master en Science agronomique. Université Kasdi Merbah, Ouargla : 23.
9. **BAE Y., YIM H., LEE K., PYO S., 2006-** Activation of murine peritoneal macrophages by sulfated exopolysaccharide from marine microalga Gyrodinium impudicum (strain KG03): Involvement of the NF- κ B and JNK pathway. International immunopharmacology 6(3), 473-484.
10. **BARBEROUSSE H., 2006-** Etude de la diversité des algues et des cyanobactéries colonisant les revêtements de façade en France et recherche des facteurs favorisant leur implantation . Thèse de doctorat en phycologie appliquée. Muséum National D'histoire Naturelle(France) : 186 p.
11. **BARSANTI L, GUALTIERI P., 2014-** Algae Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology. editonmsdLLC . Taylor & Francis.320p.

12. **BARSANTI L., GUALTIERI P., 2006-** Algae Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology. 1^{editon}. LLC. Taylor and Francis. 320p.
13. **BARSANTI L., GUALTIERI P., 2014-** Algae Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology.2^{editon} LLC. Taylor and Francis. 320p.
14. **BARSANTI L., GUALTIERI P., 2006-**Algae Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology. editoner LLC . Taylor & Francis. 320p.
15. **BECERRA.C., 2009-** Proposition de Stratégies de Commande pour la Culture de Microalgues dans un Photobioréacteur Continu, Thèse de Doctorat, Ecole Centrale des Arts et Manufactures 243 p.
16. **BECKER W., 2004-** Microalgae in human and animal nutrition. In Handbook of Microalgal Culture. ed A. Richmond, Blackwell, Oxford. 312-351p.
17. **BECKER E.W., 1994-** Microalgae biotechnology and microbiology. *In: Baddiley J., Carey N.H., Higgins I.J. (Eds.) Cambridge Studies in Biotechnology.* United Kingdom, Cambridge, Cambridge University Press. 304 p.
18. **BELCHER H., SWALE E., 1982-** Culturing Algae A guide for schools and colleges. Titus Wilson & Son Ltd, Kendal. United Kingdom. p.25
19. **BERGMAIER., 2002-** Production d'exopolysaccharides par fermentation avec des cellules immobilisées de LB. Rhamnosus RW -9595M d'un milieu à base de perméat de lactosérum. Thèse de Philosophiae Doctor (Ph.D.). De l'Université Laval.149 p.
20. **BIOLABO, 2012-** BIO-CK TCA Kaolin. Fiche technique. 2p.
21. **BIOLABO, 2013-** BIO-TP. Taux de prothrombine (TP). Fiche technique. 2p.
22. **BLANCHETON A., 1985-** Production d'Algues unicellulaires . Rapport IFREMER. PALAVAS.17 p.
23. **BOROWITZKA L. J., 1991-**Development of Western biotechnology algal beta-carotene plant. Bioresource Technology, vol 38(2-3), 251–252p.
24. **BOROWITZKA M A., BOROWITZKA J. L ., KESSLY D., 1990-** Effects of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga *Dunaliellasalina*. *Applied Phycology*, vol 2: 111-119p.
25. **BOROWITZKA MA., SIVA C ., 2007-** The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. *Journal of Applied Phycology*, vol 19 : 567–590p.
26. **BOROWITZKA M., 1988-** Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *Journal of Applied Phycology*, vol 4 : 267–279p.

27. **BOROWITZKA M., 2013-** High-value products from microalgae Their development and commercialisation. *J. Appl. Phycol.*, 25, 743–756.
28. **BOROWITZKA M., 1995-** Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *Journal of Applied Phycology* 7(1), 3-15.
29. **BOURRELLY P., 1990-** les Algues d'eau douce .Tome 1.Edition. N Boubée. Paris.569 p.
30. **BROCK. T., 1973-** Lower pH limit for the existence of bleu green algae:evolutionary and ecological implications .*science*, Vol 179: 480 -483.
31. **CADORET P., BERNARD O., 2008-** La production de biocarburant lipidique avec des microalgues:promesses et défis. article paru dans le journal de la Société de Biologie, vol 202 (3), 201-211p.
32. **CANTIN I., 2010-** La production biodiesel à partir des Microalgues ayant un métabolisme hétérotrophe. Mémoire de maître en environnement. Université de Sherbrooke, 87p.
33. **CAQUET R., 2004-**250 examens de laboratoire.11^{ème} Ed Masson. Paris 380 p.
34. **CARMELO R., 1997-**Identifying marine Phytoplankton. Academic Press: 858.
35. **CERNING, J., 1994-** Polysaccharides exocellulaires produits par les bactéries lactiques. dans I.H. Roissart, Luquet, F.M., ed. *Bactéries Lactiques*, Grenoble, France. 309-329.
36. **CHANG J ., LE K., SONG X., JIAO K., ZENG X., LINGX., SHI T., TANG X., SUN Y., LIN L., 2017-** Scale-up cultivation enhanced arachidonic acid accumulation by red microalgae *Porphyridium purpureum*. doi:10.1007/s00449-017-1831.
37. **CHEN B., YOU W., HUANG J., YU Y., WEIPING CHEN W., 2010-** Isolation and antioxidant property of the extracellular polysaccharide from *Rhodella reticulata*. *World J Microbiol Biotechnol* 26:833–840.
38. **CHEVANTON M. L., 2013-**Interactions microalgues-bactéries en système expérimental bispécifique:effets sur la croissance de *Dunaliella* sp.Thèse de Doctorat Discipline : Physiologie, biologie des organismes et des populations, interactions. Université de Nantes, 198p.
39. **CHOJNACKA K. M. R. F. J., 2004-** Kinetic and Stoichiometric Relationships of the Energy and Carbon Metabolism in the Culture of Microalgae. *Biotechnology*, vol 3 (1): 21-34p.

40. **COLEMAN AW., PRÖSCHOLD T., 2005-** Control of sexual reproduction in Algae in culture. In: Algal culturing techniques, 2^e edition. Elsevier Academic Press; Physiological Society of America. Andersen Robert A. 389–397p.
41. **COLLIEC S., BRETAUDIÈRE J., PATRICK D., FISCHER A.M., JACQUELINE J., BERNARD K., VIDAL C., 1990-** Polysaccharides sulfates, agent anticoagulant et agent anticomplémentaire obtenus à partir de fucanes d'algues brunes et leur procédé d'obtention.
42. **CONVERTI A., ALESSANDRO A., CASAZZA., ERIKA Y., ORTIZ., P PEREGO., MARCO DEL BORGHI., 2009-** Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production Chemical Engineering and Processing, vol 48 :1146–1151.
43. **COSTA L., FIDELIS, G., CORDEIRO S., OLIVEIRA R., SABRY.A., CIARA R., NOBRE, L., COSTA, M., ALMEIDA-LIMA J., FARIAS C., LEITE E., ROCHA H., 2010-** Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. Biomed. Pharmacother. 64, 21–28.
44. **D.G.F, 2004 -** Atlas des zones humides algériennes d'importance internationale. Ed. Direction générale des forêts. Doc. Poly., Alger, 60p.
45. **DANIEL G.F., CHAMBERLAIN A.H 1981-** Copper Immobilization in Fouling Diatoms. Botanica Marina, vol 24: 229-244.
46. **DE MORAIS M., VAZ BDA S., DE MORAIS EG., COSTA JA. ,2015-** Biologically active metabolites synthesized by microalgae. Biomed Res Int 2015: 835761.
47. **DEJOYE TANZI C., 2013-** Eco-Extraction et Analyse de lipides de micro-algues pour la production d'algo-carburant. Thèse de doctorat en chimie. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse. 187p.
48. **DELATTRE C., PIERRE G., LAROCHE C., MICHAUD P., 2016-** Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides Biotechnology Advances. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.001>.
49. **DIADIÉ D., 2009-** Production d'aliments enrichis en acides gras polyinsaturés à partir de microalgues pour les besoins aquacoles. mémoire .Québec à Rimouski .139p.

50. **DOUCHA J., STRAKA F., LÍVANSKÝ K., 2005**-Utilization of flue gas for cultivation of microalgae *Chlorella* sp. in an outdoor open thin-layer photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*, vol 17 (5): 403–412.
51. **EL ARROUSSI H., BENHIMA R., ELBAOUCHI A., SIJILMASSI B., EL MERNISSI N., AAFSAR A., MEFTAH-KADMIRI I., BENDAOU N. , SMOUNI A., 2018**- *Dunaliella salina* exopolysaccharides: a promising biostimulant for salt stress tolerance in tomato (*Solanum lycopersicum*) *Journal of Applied Phycology* : 1382-1.
52. **ELALAMY I., 2012**-Héparines: structure, propriétés pharmacologique et activités, EMC (Elsevier Masson SAS, Paris) , Hématologie ,vol. 13-022.
53. **FABREGAS J., GARCIA D., FERNANDEZ-ALONSO M., ROCHA A.I., GOMEZ-PUERTAS P., ESCRIBANO J.M., OTERO A., COLL J., 1999**- In vitro inhibition of the replication of haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) and African swine fever virus (ASFV) by extracts from marine microalgae. *Antiviral research* 44(1), 67-73.
54. **FARIAS E., LEITE E., ROCHA H., 2010**- Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomed. Pharmacother.* 64, 21–28.
55. **FEUGA A.,1997**- Microalgues marines Le senjeux de la recherche. ED.IFREMER.P 35
56. **FLOCH A.L., JOURDES M., TEISSEDRE P.L., 2015**- Polysaccharides and lignin from oak wood used in cooperage: Composition, interest, assays: A review. *Carbohydrate Research*, vol. 417:94–102.
57. **FREITAS F., TORRES A., C., REIS A., 2017**-Engineering aspects of microbial exopolysaccharide production, *Bioresource Technology*.No. 05:092.
58. **GINZBERG A., KORIN E., 2008**- Effect of drying on the biological activities of a red microalgal polysaccharide. *Biotechnology and bioengineering* 99(2), 411-420.
59. **GINZBURG M., 1987**-DUNALIELLA - a green-alga adapted to salt. *Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology*, vol 14 : 93–183p.
60. **GONZALEZ M. A., GOMEZ P. I., POLLE J. E. W., 2009**-Taxonomy and phylogeny of the genus *Dunaliella*. In the book : Rao DV (eds) *The Alga Dunaliella - Biodiversity, Physiology, Genomics, and Biotechnology*. 15–44p.
61. **GOUVETA L., 2011**- *Microalgae as a Feedstock for Biofuels*, London: Springer, 1 – 69 p.

62. **GUEDES A. C., XAVIER F. M., 2012-** Nutritional Value and Uses of Microalgae in Aquaculture, Aquaculture, InTech. Dr. Zainal Muchlisin (Ed.), ISBN: 978-953-307-974-5, 390p.
63. **GUILLARD R. L., 2005-** Purification Methods for Microalgae *in* **ANDERSEN A.,** Algal Culturing Techniques.Elsevier Academic Press.USA.117-132 p.
64. **GUZMAN S., GATO A., LAMELA M., FREIRE-GARABAL M., CALLEJA J., 2003-** Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of polysaccharide from *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytotherapy Research* 17(6), 665-670.
65. **HACINI M., 2012-** Evolution de la salinité des eaux du chott de Ain El Beida (Cuvette de Ouargla) Protection of environment and water quality: the basis for agricultural production, *Food Security and sustainable development* 236 -243.
66. **HALILAT MT., 1993-** Etude de la fertilisation azotée et potassique sur le blé dur (variété aldura) en zone sahariennes. (Régions Ouargla). Thèse Magister. Univ, Batna, 130p.
67. **HARTLEY B., BARBER H.G., CARTER J.R., SIMS P.A., 1996-** An atlas of British diatoms. 290 pls. Bristol: Biopress Ltd. 1-601 p.
68. **HASLE G.R. ,SYVERTSEN E.E., 1996-**Marine diatoms. In: *Identifying Marine Phytoplankton*.Tomas, C.R. Eds, San Diego: Academic Press. 5-385 p.
69. **HAYASHI T., HAYASHI K., MAEDA M., KOJIMA I., 1996-** Calcium spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga *Spirulina platensis*. *Journal of Natural Products* 59(1), 83-87.
70. **HOFF H., SNELL W., 1987-** Plankton culture manual.ED.Floride Aqua Farms, Inc.,USA., 186 P.
71. **HU Q., 2004-**Environmental effects on cell composition *In* : **RICHMOND A.,** *Handbook of Microalgal Culture - Biotechnology and Applied Phycolog.* 2edition. Blackwell Publishing Ltd. 566p
72. **IRHIMEH M., HELEN FITTON J., LOWENTHAL M., 2009-** Pilot clinical study to evaluate the anticoagulant activity of fucoida. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*20:000–000.
73. **KARAKI N., SEBAALY C., CHAHINE N., FAOUR T., ZINCHENKO A., RACHID S. KANAAN H., 2013-** The antioxidant and anticoagulant activities of polysaccharides isolated from the brown algae *Dictyopteris polypodioides*

- growing on the Lebanese coast. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, vol. 3: 043 – 051.
74. **KIM G-Y., HEO J., KIM H-S., HAN J I., 2017-** Bicarbonate-based Cultivation of *Dunaliella salina* for Enhancing Carbon Utilization Efficiency, *Bioresource Technology*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech>.
 75. **KLEIN B., WALTER C., LANGE H., BUCHHOLZ R., 2012-** Microalgae as natural sources for antioxydative compounds. *Journal of applied phycology*24(5):1133-1139.
 76. **KORNPROBST J.M. 2005-** Substances naturelles d'origine marine. 2 volumes TEC & DOC/Lavoisier (Eds). 1-1800.
 77. **KOULL N., CHEHMA A., HAMOUDA N. , BELLAHCENE O., GUEZZOUN N., 2016-** qualite des eaux des zones humides du bas sahara Algerien. *Revue des BioRessources* Vol 6 N° 1 : 113- 124
 78. **KUMAR A., SARINA E., XIN Y., ASHISH S., QIONG Z., JO DEWULF., F. XAVIER MALCATA., AND HERMAN VAN LANGENHOVE., 2010-** Enhanced CO2 fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. *Trends in Biotechnology*, Volume 28 : 371-380p.
 79. **LEE N., AMY G., CROUE P., 2006-** Low-pressure membrane (MF/UF) fouling associated with allochthonous versus autochthonous natural organic matter. *Water research* 40(12), 2357-2368.
 80. **LI B., LU F., WEI X., ZHAO R. 2008-**Fucoidan: structure and bioactivity. *Molecules*,; 13:1671–1695.
 81. **LIU L., POHNERT G., WEI D., 2016-** Extracellular Metabolites from Industrial Microalgae and Their Biotechnological Potential *Mar. Drugs*, 14, 191.
 82. **MACEDO M.F., MILLER A.Z., DIONÍSIO A., SAIZ-JIMENEZ C., 2009-** Biodiversity of cyanobacteria and green algae on monuments in the Mediterranean Basin: an overview. *Microbiology (Reading, England)*, 155(Pt 11), 3476–90.
 83. **MAGALHAES K. , COSTA L., FIDELIS G., PEREIRAG., OLIVEIRA R. , BARRETO NOBRE L., DANTAS-SANTOS N., CAMARA R., ALBUQUERQUE I., , CORDEIRO S., SABRY D., , COSTA M., , ALVES L., ROCHA H., 2012-** Anticoagulant, Antioxidant and Antitumor Activities of Heterofucans from the Seaweed *Dictyopteris delicatula* . *Int. J. Mol. Sci.* , 12, 3352-3365.

84. **MANALLAH A., 2012-** Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive «*Olea europaea L.*». Thèse de magister de l'Université Ferhat Abbas, SétifAlgerie: 82p.
85. **MANOJ SARAVANA GURU M., MAHESH KUMAR P. S., VASANTHI M., ANANT A. 2013-** Anticoagulant property of sulphated polysaccharides extracted from marine brown algae collected from Mandapam Island, India Afr. J. Biotechnol. 1937 1945.
86. **MARK H., 1980-** Modelling of algal production system.InG .Shelef et C . J .Soeder(Eds) *Algae Biomass*, Elsevier Press, Amsterdam. 361-383p.
87. **MARTA S., MADEIRA., CARLOS CARDOSO., PAULA A.,LOPES, DIOGO COELHO, CLÁUDIA AFONSO., NARCISA M., BANDARRA., JOSÉ A.M.,PRATES., 2017-**Microalgae as feed ingredients for livestock production and meat quality: a review PII: S18711413 (17) 302858 DOI : <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci>.
88. **MATA T. M., MARTINS A. A., CAETANO N., JAN., 2010-** Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*,vol 14 (1): 217-232p.
89. **MATSUI, M.S., MUIZZUDDIN, N., ARAD, S., MARENUS, K., 2003-** Sulfated polysaccharides from red microalgae have antiinflammatory properties in vitro and in vivo. *Applied biochemistry and biotechnology* 104(1), 13-22.
90. **MEYTHIAZ A ., 2003-** Etude d'assainissement des eaux résiduaires pluviales etd'irrigation mesures complémentaires de lutte contre le remonte de la nappe phréatique : voletétude d'impact sur l'environnement : Mission I I B caractérisation environnementale de lasituation actuelle. Lousonne 36P.H.
91. **MIAO X., WU Q., 2006-** Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology*, Vol 97 : 841-846p.
92. **MICHAUD J. C., 2016-**Stratégie de culture algale en deux étapes afin de produire des biocarburants. Mémoire. Université du Québec, 104p.
93. **MISHRA A., MANDOLI A., JHA B., 2008-** Physiological characterization and stress induced metabolic responses of *Dunaliella salina* isolated from salt pan. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol 35(10), 1093–1101p.
94. **MISRAHI M., UNITD I ., MEDURI G., BOUVATTIER C., ATGER M., LOOSFELT H ., 1981-** Conadotroin receptors and thecontrol of gonadal steroidogenesis: physiology and pathology ,vol. 12.

95. **MONTOYA H., OLIVERA A., 1993-** *Dunaliella salina* from saline environments of the central coast of Peru. *Hydrobiologia*, vol 267:155–161p.
96. **MULLOY B., MOURAO P.A.S., GRAY E., 2000-** Structure/function studies of anticoagulant sulphated polysaccharides using NMR. *Journal of Biotechnology*, vol(77) :123-135.
97. **NGO D., KIM S., 2013-** Sulfated polysaccharides as bioactive agents from marine algae *International Journal of Biological Macromolecules* 62: 70– 75.
98. **O.N.M., 2007-** Office National de Météorologie, données climatiques de la période 2001-2007 station de Ouargla.
99. **OREN A., 2005-** A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005. *Saline Systems (Open Access)* 1:1–14. DOI: 10.1186/1746-1448-1-2.
100. **PARKER C., 2013-** The effect of environmental stressors on biofilm formation of *Chlorella vulgaris*. Master Thesis, Appalachian State University.
101. **PEREIRA M.S., VILELA-SILVA A., VALENTE A., MOURÃO P., 2002-** A 2-sulfated, 3-linked α -L-galactan is an anticoagulant polysaccharide. *Carbohydrate research* 337(21), 2231-2238.
102. **PEREZ-GARCIA O., ESCALANTE F.M.E., DE-BASHAN L.E., BASHAN Y., 2011-** Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, vol 45 : 11-36p.
103. **PEUDON O., 2013-** Gestion en médecine générale des nouveaux anticoagulants oraux lors de chirurgie ambulatoire ou gestes techniques. Thèse de Doctorat de l'Université de Joseph Fourier-Grenoble, France: 23p.
104. **PITTMAN J. K., DEAN A. P., OSUNDEKO O., 2011-** The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources," *Bioresour. Technol*, vol 102 : 17-25 p.
105. **POLLE J., TRAN D., BEN-AMOTZ A., 2009-**History, distribution and habitats of Algae of the genus *Dunaliella* TEODORESCO (Chlorophyceae). In: *The Alga Dunaliella*, SciencePublishers. A. Ben-Amotz, J. E.W. Polle, D. V. Subba Rao, p 1–15.
106. **PONCELET J. L., 2012-** Le Syndrome Hémorragique. Société Nationale Des Groupements Techniques Vétérinaires. Fiche n° 177, 1-8.
107. **RACHLINE C., 2012-** Utilisation des dispositifs de mesure de l'INR capillaire par les professionnels de santé en établissement d'hébergement pour personnes âgées dépendantes (EHPAD) pour la gestion des traitements

- antivitamine K par le médecin généraliste : une étude de faisabilité. Thèse doctorat. Université Paris Descartes. 99p.
108. **RADONIC A., THULKE S., ACHENBACH J., KURTH A., VREEMANN A. KÖNIG T., WALTER C. POSSINGER K., NITSCHKE A., 2010-** Anionic polysaccharides from phototrophic microorganisms exhibit antiviral activities to Vaccinia virus. *J. Antivir. Antiretrovir.* 2, 51–55.
109. **RAPOSO M.F.D.J., DE MORAIS R.M.S.C., BERNARDO DE MORAIS A.M.M., 2013-** Bioactivity and applications of sulphated polysaccharides from marine microalgae. *Marine drugs* 11(1), 233-252.
110. **RAPOSO M.F.J., MORAIS A.M.M.B., MORAIS R.M.S.C., 2015-** Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications. *Mar. Drugs* 13(5), 2967-3028.
111. **RAS M., STEYER J. P. H., BERNARD O., 2013-** Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production, *Rev Environ Sci Biotechnol.* 12:153–164 DOI 10.1007/s11157-013-9310-6.
112. **RICHARD B., 2013-** Physiologie de la coagulation. Inserm U698. 66p.
113. **RICHMOND A., 2008-** *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology.* 2^e édition John Wiley et Sons. p455.
114. **RICHMOND A., 2004-** *Handbook of microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology.* 1^e édition. Blackwell Science Ltd. 556p.
115. **RIOUX L., 2010-** Caractérisation structurale et évaluation de l'activité biologique de polysaccharides extraits de *Saccharina longicruris* Thèse de doctorat présentée à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval : 4-41.
116. **ROGER O., 2002-** Etude d'oligosaccharides bioactifs issus d'exopolysaccharides bactériens : obtention, caractérisation et relation structure/fonction. Thèse Doctorat De l'Université De Paris 13, France: 7p.
117. **RUOCCO N., COSTANTINI S. , GUARINIELLO S., COSTANTINI M., 2016-** Polysaccharides from the Marine Environment with Pharmacological, Cosmeceutical and Nutraceutical Potential. *Molecules* No. 21: 551.
118. **SADI M., 2012-** Les micro algues: un défi prometteur pour des biocarburants propres. *Revue des Energies Renouvelables SIENR* No. 12 :195 – 202.
119. **SANCHEZ M., 2006-** Polysaccharides ayant une activité immunomodulatrice chez les champignons indigènes du Québec. Thèse de doctorat de l'Université Laval de Québec : 11-12.

120. **SHANMUGAM M. , MODY K. H., 2000-** Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents. *CURRENT SCIENCE*, VOL. 79, NO. 12, 25.
121. **SIALVE B., STEYER J-P., 2013-** Les microalgues promesses et défis. *Innovations Agronomiques*, vol. 26 : 25-39p.
122. **SOUZA R.O., MADEIRA J., CHAGAS F., PARREIRAS L., SANTOS G., ASSREUY A., MOUR A., PEREIRA M., 2015-** Purified polysaccharides of *Geoffroe aspinosa* barks have anticoagulant and antithrombotic activities devoid of hemorrhagic risks. *Carbohydrate Polymers* vol (124):208-21.
123. **SPOLAORE P., JOANNIS-CASSAN C., DURAN E., ISAMBERT A., 2006-** Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101.
124. **STRUVER G. P., BITTNER D. L. Am. J., 1962-** *Clin. Path*, vol. 38: 473-481.
125. **SUN L., WANG C., SHI Q., MA C., 2009-** Preparation of different molecular weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum* and their antioxidant activities. *International journal of biological macromolecules* 45(1), 42-47.
126. **SUTHERLAND I., 1979-** Microbial exopolysaccharides: control of synthesis and acylation. In Berkeley, R.C.W., Gooday, G.W., Ellwood, D.C. (Eds.), *Microbial Polysaccharides and Polysaccharases*. Academic Press, London, UK, pp. 329-338.
127. **SYNYTSYA A., CHOI DJ., POHL R., NA YS., CAPEK P., LATTOVÁ E., 2015-** Structural Features and Anticoagulant Activity of the Sulphated Polysaccharide SPS-CF from a Green Alga *Capsosiphon fulvescens*. *Mar Biotechnol. déc*;17(6):718-35.
128. **T. A. D., 2002-** Rapport étude de réalisation d'un plan de gestion de la zone humide chott d'AïnEl-Beïda, Ouargla. Territoire. Aménagement. Développement. Ed. Conservation générale des forêts, Ouargla, 75p.
129. **TAE PARKG., GOR., LEE H., LEE G., KIM C., SEO J., HONG W., CHOI K., HWANG K., 2017-** Potential Anti-proliferative and Immunomodulatory Effects of Marine Microalgal Exopolysaccharide on Various Human Cancer Cells and Lymphocytes In Vitro. *Mar Biotechnol*19:136–146.
130. **TEODORESCO C., 1905-** Organisation et développement du *Dunaliella*, nouveau genre de Volvocaceae-Polyblepharidaeae, *Beih Bot Zentralblatt*, vol 18:215–232.
131. **TIETZ W., 2006-** *Clinical guide to laboratory test*, 4 éme Edition. 46-47p.

132. **TOMASELLI L., 2004**-The microalgal cell.In: RICHMOND A., Handbook of microalgal culture.Oxford.UK;Blackwell Science.3-19p.
133. **TRABELSI L., CHAIE O., MNARI A., ABID-ESSAFI S., ALEYA L., 2016**-Partial characterization and antioxidant and antiproliferative activities of the aqueous extracellular polysaccharides from the thermophilic microalgae *Graesiella* sp. BMC Complement. Altern. Med. 16, 210.
134. **TREYTURE C., CHAUVIN C., MENAY M., DUTARTRE A ., 2010**-Protocole standardisé d'échantillonnage et de conservation du phytoplancton en grands cours d'eau applicable aux réseaux de mesure DCE .Document du Groupe de Travail DCE-ESC.ED.Cemagref. 19 p.
135. **TZIANABOS A.O, 2000**- Polysaccharide Immunomodulateurs as Therapeutic Agents: Structural Aspects and Biologic Function. *ClinicalMicrobiologyReviews*, vol(13):523-533
136. **VAN BAALEN C., HOARE D. S., BRANDT E., 1970**-Heterotrophic Growth of Blue-Green Algae in DimLight, In University of Texas, Marine Science Institute Port Aransas, Texas. NIH Pubmedcentral. Vol 78: 4. 310–321p.
137. **VENUGOPAL V., 2011**- Marine Polysaccharides Food Applications.ED.CRC Press Taylor & Francis Group; 352p.
138. **VILLAY A., 2013**- Production en photobioréacteurs et caractérisation structurale d'un exopolysaccharide produit par une microalgue rouge : *Rhodella violacea*. Application à l'obtention d'actifs antiparasitaires.Thèse de doctorat. Science des Aliments. Universite Blaise Pascal.FRANCE .179p.
139. **KUMAR V., NANDA M., VERMA M., 2017**- Application of Agar liquid-gel transition in cultivation and harvesting of microalgae for biodiesel production. *Bioresource Technology*, S0960-8524(17)30984-7.
140. **WANG X., ZHANG Z., YAO Z., ZHAO M., QI H., 2013**- Sulfation, anticoagulant and antioxidant activities of polysaccharide from green algae *Enteromorpha linza*. *International Journal of Biological Macromolecules* 58 (2013) 225– 230.
141. **XIAO R., ZHENG Y., 2016**- Overview of Microalgal Extracellular Polymeric Substances (EPS) and Their Applications. S0734-9750(16)30105-7.
142. **YANG L., ZHANG L. M. 2009**- Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources carbohydrate Polymers, Vol.76: 349-361.

143. **YIM J., KIM S., AHN S., LEE C., RHIE T., LEE H., 2004**-Antiviral effects of sulfated exopolysaccharide from the marine microalgae *Gyrodinium impudicum* strain KG03. *Mar. Biotechnol.*, 6, 17–25.
144. **YOON S.J., PEREIRA M.S., PAVAO M.S.G., HWANG J., PYUN Y., MOURAO P.A.S., 2002**-The medicinal plant *Porana volubilis* contains polysaccharides with anticoagulant activity mediated by heparin cofactor II, 51-58.
145. **ZEMKE P. E., WOOD B. D., DYE DJ., 2010**- Considerations for the maximum production rates of triacylglycerol from microalgae. *Biomass energy*, Vol 34: 1. 145-151p.
146. **ZHANG H., WENBERG E., CROSB J., ROBERT MACLEOD A., ZHAO C., GAO D., BLACK C., REVENKO A., MEIJERS J., STROES E., LEVI M. , MONIA P., 2010**- Inhibition of the intrinsic coagulation pathway factor XI by antisense oligonucleotides: a novel antithrombotic strategy with lowered bleeding risk. *Journal Blood* Vol.116(22): DOI 10.1182/blood-2010-04-277798.
147. **ZHANG HJ., MAO WJ., FANG F., LI H., SUN HH., CHEN Y., QI X., 2008**- Chemical characteristics and anticoagulant activities of a sulfated polysaccharide and its fragments from *Monostroma latissimum*. *Carbohydr. Polym.* 71:428-434.
148. **ZIDANI H., 2015**- les exopolysaccharides des bactérieies lactiques: optimisation et cinétique de production .Mémoire de magister en BIOLOGIE ,Université Ahmed Ben Bella.Oran.11p.

Annexes

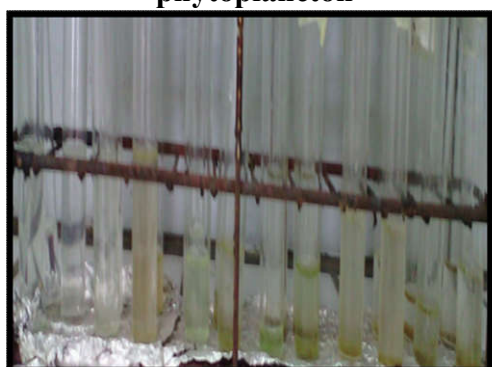
Annexe 1



Filtration de l'eau à l'aide de filet à phytoplancton



La préculture



Couleurs des dilutions maximales après 4 semaines d'incubation



Incubation des dilutions à côté de la fenêtre



Conservation de *D.salina* dans 15 ml de milieu liquide



Conservation de *Navicula sp.* dans 15 ml de milieu liquide



Inoculation des souches pures dans le milieu liquide



Lyophilisat d'EPS de *D.salina*

Annexe 2

Les photos du matériel utilisé au cours de l'expérimentation sont présentées.



Conductivimètre



PH mètre



La loupe binoculaire



Microscope optique



Four pasteur



Phytotron

Annexe 3

Tableau I: Résultats de test TP pour l'activité anticoagulante de l'extrait exopolysaccharidiques issus de *D.salina*.

Concentration d'échantillon	TP(%)	INR	TQ(sec)
Contrôle négatif	100	1,00	12,5
1.25 µg/ µl	66,4	1,38	15,1
2.5 µg/ µl	54	1,62	16,6
50 µg/ µl	43	2,07	19,2
10 µg/ µl	26,6	3.47	26.1
Héparine	300	-	-

Annexe 4

Tableau II: Résumé des teneurs en monosaccharides et en acide glucuronique des EPS de différentes micro-algues (XIAO et ZHANG, 2016).

Microalgues	Espèces	Teneur en monosaccharides
Algues vertes	<i>Dunaliella salina</i>	Glu, Gal, Fru, et Xyl=105, 130, 160, et 110 µg/L ^a , respectivement
	<i>C. vulgaris</i>	Glu, Xyl et GlcUA
	<i>Chlorella ellipsoidea</i>	Glu Ara, GlcUA, et Fuc
	<i>Chlamydomonas sp.</i>	Glu, Xyl et Fuc
	<i>Oocystis sp.</i>	Gal, Ara, GlcUA, et Fuc
	<i>Chlorella sp.</i>	Glu, Ara, GlcUA, et Rha
	<i>Chlorella sp.</i>	Glu (193 g/kg), Fuc (45 g/kg), Ara (325 g/kg), et GlcUA (385 g/kg)
	<i>B. braunii</i>	Glu, Gal, Fuc, Ara, Rha, et GlcUA
	<i>Scenedesmus acuminatus</i>	Man (76), Xyl (3), GlcUA (9), Gal (2.5), Ara (0.5), Fuc (3.5), Rha (2.5), et GalUA (3) ^b
	<i>Spondylosium panduriforme</i>	Glu, Ara, Fuc, Xyl, Gal, Rha, et GlcUA
<i>Hyalotheca dissiliens</i>	Glu, Ara, Fuc, Xyl, Gal, Rha, et GlcUA	
Diatomées	<i>Chaetoceros affinis var. willei (Gran) Hhustedt</i>	Mainly: (Rha + Fuc=63%) ^b , Ara et Gal Autres: Glu, Man et Xyl
	<i>C. closterium</i>	Glu/Gal/Man/Rha/Ara/Xyl=22.9/12.2/4.1/14.7/0/46.1 ^c
	<i>Navicula salinarum</i>	Glu/Gal/Man/Rha/Ara/Xyl=41.6/19.1/13.8/5.6/0/20.2 ^c
	<i>Achnanthes longipes</i>	Glu/GlcUA/Gal/Man/Gul/Xyl/Ara/Fuc/Rha=11/10/25/16/0/10/3/23/3 ^b
	<i>Amphora coffeaeformis</i>	Glu/GlcUA/Gal/Man/Gul/Xyl/Ara/Fuc/Rha=40/7/13/13/0/9/0/9/9 ^b
	<i>Cymbella cistula</i>	Glu/GlcUA/Gal/Man/Gul/Xyl/Ara/Fuc/Rha=4/0/69/3/0/18/1/0/2 ^b
	<i>Cymbella mexicana</i>	Glu/GlcUA/Gal/Man/Gul/Xyl/Ara/Fuc/Rha=5/1/57/12/0/16/1/2/6 ^b
	<i>Coscinodiscus nobilis</i>	Fuc, Rha, Man, Glu, Xyl, Gal, Ara, et Glc UA
	<i>Cylindrotheca fusiformis</i>	Gal/Glu/Man/Xyl/Rha/Fuc=37.7/26.5/5.4/13/12.9/4.4 ^a
<i>Pinnularia viridis</i>	Rha/Fuc/Xyl/Ara/Glu/Man/Gal=79/32/62/5/80.5/51.5/52 ^c	

* Glu = glucose, Gal = galactose, Gul = gulose, Fru = fructose, Xyl = xylose, Ara = arabinose, Rha = rhamnose, Man = mannose, Fuc = fucose, GlcUA = acide glucuronique et GalUA = acide galacturonique.

a une unité est un microgramme de monosaccharide par litre de surnageant, b % poids en sucre total, c % mole, d % en poids EPS total.

Annexe 5

Tableau III: Principales activités biologiques des exopolysaccharides provenant des microalgues (DELATTRE *et al.*, 2016).

<i>Espèces</i>	<i>Polys.</i>	<i>Activités biologiques</i>
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (Ba)	EPS	Activités anti-inflammatoires, immunomodulatrices
<i>Chlorella stigmatophora</i> (Cha)	EPS	Activités anti-inflammatoires, immunomodulatrices
<i>Arthrospira platensis</i> (Cy)	EPS	Activités antivirales, anti-tumorales
<i>Arthrospira maxima</i> (Cy)	EPS	Activités antivirales
<i>Gyrodinium impudicum</i> (Mi)	EPS	Activités antivirales, immunomodulatrices, anti-tumorales
<i>Cochlodinium polykrikoides</i> (Mi)	EPS	Activité antivirale
<i>Porphyridium sp.</i> (Rh)	EPS	Activités antioxydantes, antivirales, hypocholestérolémiques, immunomodulatrices, anti-tumorales
<i>Porphyridium cruentum.</i> (Rh)	EPS	Activités antioxydantes, antivirales, hypoglycémiques, anti-tumorales
<i>Porphyridium marinum</i> (Rh)	EPS	Activité antimicrosporidienne,
<i>Porphyridium purpureum</i> (Rh)	EPS	Activité antivirales, antimicrosporidienne
<i>Rhodella reticulata</i> (Rh)	EPS	Activités antioxydantes, antivirales, hypoglycémiques, activité anti-tumorales
<i>Rhodella violaceae</i> (Rh)	EPS	Activité antimicrosporidienne

Ba: *Bacillariophyta*, Cha: *Charophyta*, Cy: *Cyanobacteria*, Ha: *Haptophyta*, Mi: *Miozoa*, Rh: *Rhodophyta*