

THESE

En vue de l'obtention du : **DOCTORAT**

Structure de Recherche : Laboratoire de physiologie et biotechnologie végétale

Discipline : Biologie

Spécialité : Physiologie et Biotechnologie des microalgues

Présentée et soutenue le : **Date de soutenance (06/06/2018) par :**

Hicham EL ARROUSSI

**Etude du potentiel des microalgues marocaines comme
biostimulants de la germination, la croissance et la tolérance des
plantes au stress salin pour leur valorisation en agriculture**

JURY

Pr Allal DOUIRA	PES, Université Ibn Tofail. Faculté des Sciences, Kénitra	<i>Président</i>
Pr. Najib BENDAOU	PES, Faculté des Sciences, Université Mohammed V, Rabat	<i>Directeur de thèse</i>
Pr Abdelaziz SMOUNI	PH, Faculté des Sciences, Université Mohammed V, Rabat	<i>Co-directeur de thèse</i>
Pr. Nadia MESKINI,	PES, Université Hassan II, Faculté des Sciences et Techniques,	Rapporteur
Pr. Zine El Abidine TRIQUI,	PES, Faculté des Sciences, Université Mohammed V, Rabat	Rapporteur
Dr. Nawal MERGHOUB	Chercheur, fondation MASCIR, Rabat	Invité

Dédicaces

Je dédie cette thèse :

A mes Parents.

A mes frères : Abdelah, Ibrahim et Hassan. A mes sœurs Khadija, Fatiha, Chaibia et Fatima.

A ma femme Houda

A mes petites filles Rim et Wiam

A Redouane Benhima et sa femme Siham

A mes Amis.

A tous ceux qui me sont chers

Avant-Propos

Cette thèse a été réalisée dans le cadre d'une collaboration entre le Laboratoire de physiologie et biotechnologie végétales de la Faculté des Sciences de Rabat (Université Mohammed V) et le Centre de Biotechnologie Verte de la Fondation MAScIR. Le travail a été réalisé sous l'encadrement scientifique conjoint du **Pr. Najib Bendaou et Pr. Abdelaziz Smouni**.

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, Monsieur BENDAOU Najib, Professeur à la Faculté des Sciences, Université Mohammed V (Rabat)-Laboratoire de physiologie et biotechnologie végétale, pour m'avoir accepté au sein de son laboratoire pour réaliser ce sujet passionnant, et qui m'a donné la chance de vivre cette expérience. Je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude et mes sincères remerciements pour l'intérêt qu'il n'a cessé d'apporter à mon travail. Ses encouragements et son soutien m'ont permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions.

Je remercie vivement mon co-directeur de thèse, Monsieur SMOUNI Abdelaziz, Professeur habité à la Faculté des Sciences, Université Mohammed V (Rabat)- Laboratoire de physiologie et biotechnologie végétale, pour son soutien scientifique et pour son disponibilité. Je le remercie pour son encadrement durant cette thèse, son suivi, les idées scientifiques et les précieux conseils apportés tout au long de ces années de recherche. Je lui témoigne ma profonde reconnaissance. Vous m'avez accompagnée et soutenue tout au long de mes années de Doctorat. Merci aussi pour m'avoir fait partager votre expérience et votre culture scientifique et pour votre confiance qui est source intarissable de motivation. Travailler sous votre co-direction a été un plaisir et un honneur.

Je remercie vivement, Madame MESKINI Nadia, Professeur à la Faculté des Sciences, et Techniques de Mohammedia Université Hassan II - Laboratoire de Virologie, Microbiologie, Qualité/Écotoxicologie et Biodiversité, d'avoir accepté de rapporter cette thèse, qu'elle accepte mes sincères remerciements pour avoir consacré son temps à l'évaluation de mes travaux de recherche ainsi que pour ses jugements pertinents sur mon manuscrit.

Je remercie vivement, Monsieur Mr Zine El Abidine TRIQUI, Professeur à la Faculté des Sciences, Université Mohammed V- Agdal (Rabat)-Laboratoire de physiologie et biotechnologie végétale, d'avoir accepté de rapporter cette thèse, qu'il accepte mes sincères remerciements pour

avoir consacré son temps à l'évaluation de mes travaux de recherche ainsi que pour ses jugements pertinents sur mon manuscrit.

Je remercie vivement, Monsieur Mr Allal DOUIRA, Professeur à la Faculté des Sciences de Kénitra, Université Ibn tofail- (Kénitra)-Laboratoire de Botanique, Biotechnologie et Protection des Plantes, d'avoir accepté d'examiner cette thèse, qu'il accepte mes sincères remerciements pour avoir consacré son temps à l'évaluation de mes travaux de recherche ainsi que pour ses jugements pertinents sur mon manuscrit.

Mes remerciements vont à mes chers frères Redouane Benhima et Najib EL Mernissi de l'équipe de biotechnologie verte de MASCIR, qui ont participé énormément dans ce travail. Travailler avec vous a été un plaisir et un honneur. Il est difficile de vous remercier en quelques phrases tant je vous suis redevable. Simplement, j'ai pu réaliser ce travail en toute sérénité dans des conditions idéales grâce à vous. Mes remerciements vont de la même manière aux reste de l'équipe : Mme Imane Wahby, Mme Iman Bennis, Mme Nawal Merghoub chercheurs du laboratoire de valorisation des microalgues, centre biotechnologie verte MASCIR, Ainsi tous les membres du centre biotechnologie verte de MASCIR, Monsieur Issam Meftah-Kadmiri, Kaoutar Yaakoubi, Abderahim Aasfar, Abir Mzibra, Farid Rachidi, Chanda mutale joan, Badereddine Sijilmassi et Salah Azeroual. Merci pour vous pour m'avoir fait partager votre expérience et votre culture scientifique et pour votre confiance qui est source intarissable de motivation.

Mes remerciements vont de la même manière à Monsieur Adil EL Baouchi et Mme Imane Abdelaoui Maane. Je suis très reconnaissant pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et pour le temps qu'ils m'ont consacré pour réviser mon rapport.

J'adresse mes vifs remerciements aux membres de laboratoire biotechnologie et tout le personnel de MAScIR ; merci à tous pour les discussions fructueuses que nous avons eues ensemble et leur soutien durant la réalisation de ce projet. Ce laboratoire a été pour moi l'école où j'ai approfondi mes connaissances sur la thématique. Je tiens à remercier des personnes qui m'ont guidée ou soutenue plus tôt dans mon parcours universitaire. Je pense particulièrement à Mme Badiia Tebyaoui, professeur à la faculté des sciences EL Jadida qui m'a encadré durant mon projet de fin d'étude de master, et Mme Ibtiham Nefah Directrice de laboratoire de Microalgues à L'INRH, avec elle j'ai découvert le monde des microalgues pour la première fois, et durant les deux années que j'ai passé dans ce laboratoire, elle m'a donné le courage, la passion et l'envie de continuer dans la recherche scientifique. Leurs conseils précieux et leurs encouragements

constants qui m'ont toujours touchée. Je ne saurais leurs exprimer toute ma profonde gratitude et mon respect.

De nombreux collègues et amis m'ont également apporté leur aide lors de la réalisation et la rédaction de cette thèse : trop nombreux pour être cités, grand merci pour vous tous.

Les travaux réalisés dans cette thèse ont fait l'objet de publications scientifiques et de communications orales et affichées, présentés ci-dessous.

Publications :

- ∂ **El Arroussi, H.**, Benhima, R., EL Baouchi A., Sijilmassi B., El Mernissi, N., Meftah EL Kadmiri I, Bendaou, N., Smouni, A. (2018). Dunaliella salina exopolysaccharides a promising biostimulants for salt stress tolerance in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Journal of Applied Phycology*,1-13
- ∂ **El Arroussi, H.**, Elbaouchi, A., Benhima, R., Bendaou, N., Smouni, A., & Wahby, I. (2015). Halophilic microalgae *Dunaliella salina* extracts improve seed germination and seedling growth of *Triticum aestivum* L. under salt stress. *ISHS Acta Horticulturae*, 1148 (pp. 13-26). [DOI/10.17660/ActaHortic.2016.1148.2](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1148.2)
- ∂ **El Arroussi, H.**, Benhima, R., El Mernissi, N., Meftah EL Kadmiri I, Bendaou, N., Smouni, A., & Wahby, I. (2015).Microalgae polysaccharides as promising plant growth biostimulant.*J. Algal Biomass Utiln.* 2016, 7 (4): 55-63.
- ∂ **El Arroussi, H.**, El Mernissi, N., Benhima, R., Rachidi F, Smouni, A., Bendaou, N. (2017).Microalgal exopolysaccharides as biostimulant of plant tolerance to salt stress.*Procedia Engineering journal* 00 (2017) 000–000. (Article soumis).

Communications orales et affichées :

- **H. EL Arroussi**, R. Benhima, N. EL Mernissi, F. Rachidi, A. Smouni, N. Bendaou. (2017). “Microalgae as biostimulant of plant”. “6th Congress of the International Society for Applied Phycology”, 18-23 Juin 2017, Nantes- France. (**Communication affichée**).
- **H. EL Arroussi**, R. Benhima, N. EL Mernissi, F. Rachidi, A. Smouni, N. Bendaou. (2017). “Microalgae as biostimulant of plant tolerance to salt stress” 4ème édition du SYMPHOS-symposium International sur l'Innovation et la Technologie dans l'Industrie des Phosphates. Centre des Congres de l'Université Mohamed 6 Polytechnique-Benguerir, du 08 au 10 mai 2017 (**communication orale**).
- **El Arroussi, H.**, Benhima, R., El Mernissi, N., Meftah EL Kadmiri I, Bendaou, N., Smouni, A., & Wahby, I. (2015).Microalgae polysaccharides a promising plant growth biostimulant. 16-19 Novembre 2015, Florence convention center Italie (**communication orale**).
- **El Arroussi, H.**, Benhima, R., El Mernissi, N., Bendaou, N., Smouni, A., & Wahby, I. (2015). Microalgae biomass valorization. 2ème édition du congrès international Alg'n'Chem sur les algues et la chimie. Du 31 mars 2014 au 3 avril 2014 à Montpellier (34) – France (**Communication affichée**)

Résumé

Les microalgues sont connues comme sources de molécules bioactives importantes. Le potentiel des microalgues dans le domaine des biostimulants, résulte du fait qu'elles présentent une diversité biochimique plus importante que les macroalgues, ainsi, elles sont considérées comme source renouvelable. Le Maroc, avec sa diversité climatique et sa biodiversité algale non exploitable et qui constitue un atout et une source inépuisable dans le criblage de nouvelles molécules bioactives, pourra être comme une niche industrielle de production et valorisation des microalgues dans les différentes applications.

Le travail présenté dans ce mémoire s'inscrit dans le cadre de la valorisation des microalgues Marocaines dans le domaine de l'agriculture. Le premier objectif de ce travail est l'étude de 6 microalgues afin de chercher de nouveaux composés biostimulants des plantes. Six microalgues, isolées de différents écosystèmes aquatiques Marocains, ont été criblées pour leur activités stimulantes. Différents extraits ont été préparés et testés pour leurs potentiels biostimulants de la germination, la croissance, ainsi que la tolérance des plantes de tomate, poivron et blé au stress salin. A l'issue de cette étude, deux espèces de microalgues (*Dunaliella salina* et *Arthrospira platensis*) ont été les plus actives. Les polysaccharides de ces deux microalgues ont montré l'effet majoritaire de stimulation des plantes étudiées.

Mots clés : Microalgues, polysaccharides, biostimulants, croissance, tolerance, stress salin

Abstract

Microalgae are known as a source of bioactive compounds for the improvement and protection of plants. Recently, interest in the potentiality of microalgal extracts biostimulants, results from the fact that they have much greater biochemical diversity than seaweeds and they are also considered as renewable source. Morocco, with its climatic diversity and non-exploitable algal biodiversity, is an asset and an inexhaustible source of new bioactive molecules.

The work presented in this study is part of the valorization of Moroccan microalgae for the application of plant improvement and protection. Whose objective is the research for new compounds from microalgae that will be exerted as plant biostimulants. In this work, six microalgae species, isolated from different Moroccan aquatic ecosystems, were screened for their plant biostimulant activities. Different extracts have been prepared and tested for their potentiality as biostimulant of seeds germination, growth, and plants tolerance to salt stress. In this study, extracts from two species of microalgae (*Dunaliella salina*, and *Arthrospira platensis*) had shown to be the most bioactive. From these extracts, polysaccharides showed the predominant effect in the stimulation of germination, growth and plant tolerance to salt stress.

Key words: Microalgae, polysaccharides, biostimulants, Growth, tolerance, salt stress

خلاصة

يعتبر قطاع المنتجات الزراعية الطبيعية، وخاصة المحفزات الحيوية، سوقا متنامية في جميع أنحاء العالم. وفي مواجهة الطلب المتزايد على المواد الكيميائية، أصبح البحث عن حلول بديلة ذات أصل طبيعي هاجسا رئيسيا للعلماء والصناعيين على حد سواء. من جهة أخرى، تعتبر الطحالب مصدرا مهما للجزيئات النشطة بيولوجيا التي تعمل على تحسين وحماية النباتات. ففي الأونة الأخيرة، حصلت الطحالب الدقيقة على اهتمام متصاعد في مجال المحفزات الحيوية أكثر من الطحالب (الكبيرة) وذلك راجع إلى أنها تحوي تنوعا بيوكيميائيا أكبر ولأنها مصدر متجدد. يتميز المغرب بتنوعه المناخي وغناه البيولوجي من حيث الطحال التي لم يتم استثمارها بعد، لذلك فهو مصدر غزير لاكتشاف جزيئات نشطة بيولوجيا جديدة.

تقدم هذه الأطروحة إسهاما علميا في استغلال الطحالب الدقيقة المغربية في مجال الزراعة، بهدف إيجاد محفزات حيوية جديدة للنباتات. وقد تم عزل ستة أنواع من الطحالب الدقيقة من نظم إيكولوجية مائية مختلفة في أنحاء مغرب، ثم قمنا بفحص أنشطتها المحفزة. وبعد ذلك تم تحضير مستخلصات مختلفة من تلك الطحالب واختبار نشاطها التحفيزي على الطماطم والفلفل والقمح من حيث الإنبات والنمو وتحمل ملوحة التربة. وقد توصلنا إلى أن نوعين من الطحالب الدقيقة (دوناليسالينا، وأرثروسبيريا بلاتنيسيس) هما الأكثر تحفيزا. وأظهرت الدراسة أن المفعول التحفيزي الأكبر لهذين الطحالبين ناتج عن السكريات المتعددة من حيث الإنبات والنمو وتحمل ملوحة التربة معا.

الهدف الثاني من هذه الأطروحة هو دراسة آليات تحمل الملوحة عند دوناليسالينا، ومحاولة استغلالها لتحفيز قدرة النبات على تحمل ملوحة التربة. وبالفعل، أظهرت النتائج أن دوناليساليناراكتمت جزيئات محافظة على التناضح (الخاصية الأسموزية) كالبرولين والسكريات والكاروتينات تحت ضغط الملح، وأفرزت كمية لا بأس بها من السكريات الخارجية محافظة بذلك على الضغط الأسموزي لها. وبعد أن تم إستخلاص هاته الجزيئات، وتطبيقها على النباتات المدروسة تحت ضغط الملوحة تبين أن السكريات بتركيز 0.1 ج/لتر حفزت الإنبات عند النباتات المدروسة وقدرتها على تحمل ملوحة التربة مفرزة البرولين والسكريات المحايدة ومضادات الأكسدة، مما يعطينا فكرة على المسارات الاستقلابية التي تم تحفيزها.

كما أظهرت تقنية الاستشراب الغازي إلى جانب مطياف كتلة GC-MS، لدراسة استجابة الطماطم للسكريات المتعددة تحت تأثير الملح، أن العديد من الآليات البيوكيميائية تم تنشيطها للتخفيف من تأثير الإجهاد الملحي على النباتات ويتعلق الأمر بالآليات التي تؤثر على ليونة وصلابة الغشاء الخلوي. فقد أظهرت الدراسة تراكم حمض اللينولينيك (3: C18) أساسا وهو مقدمة لدورة لبيوكسيجيناز وحمض الجاسمونيك كما تراكتمت السلاسل الطويلة جدا من الأحماض الدهنية والألكانات التي تلعب دورا مهما في بناء الشمع والقشرة النباتية، بالإضافة إلى تراكم الجزيئات المضادة للأكسدة كالتوكوفيرول والستيغماستيرول.

ووفقا للدراسة فإننا نعتبر سكريات الطحالب مصدرا واعدة لتطوير منتجات محفزة وواقية للنباتات.

الكلمات مفتاح: الطحالب، السكريات، المنشطات البيولوجية والنباتات والنمو، الإجهاد الملحي

Table des matières

AVANT-PROPOS.....	I
RESUME	V
ABSTRACT	VI
خلاصة.....	VII
TABELE DES MATIERES.....	VIII
LISTE DES ABREVIATIONS.....	XIV
LISTE DES TABLEAUX	XVI
LISTE DES FIGURES	XVII
INTRODUCTION	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
I. LES MICROALGUES ET LEURS APPLICATIONS	4
I.1. CLASSIFICATION TAXONOMIQUE DES MICROALGUES.....	5
I.2. PRODUCTION MONDIALE ET MARCHÉ DES MICROALGUES	8
I.3. MARCHÉ ET PRODUITS DES MICROALGUES DANS L'AGRICULTURE	9
I.4. TECHNOLOGIES DE CULTURE DES MICROALGUES	10
I.4.1. Bassins ouverts.....	10
I.4.2. Photo-bioréacteurs.....	12
I.5. POTENTIEL CHIMIQUE ET BIOCHIMIQUE DES MICROALGUES SÉLECTIONNÉES.....	14
I.6. APPLICATIONS DES MICROALGUES.....	16
I.6.1. Application alimentaire.....	17
I.6.2. Bioénergie	18
I.6.3. Application des microalgues pour la protection de l'environnement.....	19
I.6.4. Application des microalgues dans le domaine cosmétique et pharmaceutique.....	20
I.6.5. Application des microalgues dans l'agriculture	21
I.7. MOLECULES D'INTERETS PRODUITES PAR LES MICROALGUES.	22
I.7.1. Les microalgues comme sources de lipides d'intérêt industriel.....	22
I.7.2. Les microalgues comme source de protéines d'intérêt	22
I.7.3. Les microalgues comme source de des pigments d'intérêt.....	23
I.7.4. Les microalgues comme source de polysaccharides d'intérêt	23
II. BIOSTIMULANTS DES PLANTES.....	24

II.1.	HISTORIQUE ET DEFINITION DES BIOSTIMULANTS.....	24
II.2.	CATEGORIES DES BIOSTIMULANTS DES PLANTES	27
II.2.1.	<i>Microorganismes bénéfiques associés aux plantes</i>	27
II.2.2.	<i>Substances humiques</i>	28
II.2.3.	<i>Hydrolysats des protéines</i>	28
II.2.4.	<i>Extraits d'algues</i>	29
II.2.5.	<i>Les polysaccharides</i>	30
II.3.	MODES D' ACTION DES BIOSTIMULANTS	31
II.3.1.	<i>Microorganismes</i>	31
II.3.2.	<i>Substance Humiques</i>	32
II.3.3.	<i>Extraits des algues</i>	33
II.3.4.	<i>Acides aminés et autres dérivés protéiques composant les biostimulants</i>	33
II.3.5.	<i>Polysaccharides</i>	34
II.3.6.	<i>Autres substances classées comme biostimulants des plantes</i>	35
II.4.	LES EFFETS MAJEURS DES PRODUITS A BASE D'ALGUES UTILISES COMME BIOSTIMULANTS DES PLANTES	36
II.4.1.	<i>Effet sur la croissance et le développement des plantes</i>	36
II.4.2.	<i>Effet sur l'assimilation des nutriments</i>	37
II.4.3.	<i>Effets sur la résistance des plantes aux stress abiotiques</i>	38
II.5.	LES MICROALGUES AU MAROC	38
II.6.	ESPECES DE MICROALGUES ETUDIEES	39
II.6.1.	<i>Les critères de choix des souches microalgues</i>	39
II.6.2.	<i>Description des souches étudiées</i>	40
CONTEXTE GENERALE :		45
OBJECTIFS DE LA THESE:		47
MATERIELS ET METHODE		48
I. MATERIEL BIOLOGIQUE ET CONDITIONS DE CULTURE		47
I.1.	LES MICROALGUES.....	47
I.1.1.	<i>Culture en Erlenmeyers</i>	48
I.1.2.	<i>Culture en photobioréacteur</i>	48
I.1.3.	<i>Suivi de la croissance des cultures et la récolte de la biomasse</i>	50
I.1.4.	<i>Amélioration de la productivité des deux souches retenues par l'addition du CO₂</i>	50
I.2.	MATERIEL VEGETALE ET CONDITIONS DE CULTURE	50
I.2.1.	<i>Les plantes étudiées</i>	50
I.2.2.	<i>Conditions de culture des plantes</i>	51

1.2.3. Culture de <i>D. salina</i> dans les conditions du stress salin	51
1.2.4. Application du stress salin sur les graines	51
1.2.5. Application du stress salin sur les plantes	52
II. METHODES D'ANALYSES.....	53
II.1. ANALYSE DE LIPIDES DES MICROALGUES.....	53
II.1.1. Extraction et dosage des lipides.....	53
II.1.2. Analyse du profil lipidique par GC-MS	53
II.2. ANALYSE DES SUCRES TOTAUX	53
II.3. ANALYSE DES PROTEINES	54
II.4. ANALYSE DES ELEMENTS CHIMIQUES NPK	54
II.4.1. Détermination de l'azote total	54
II.4.2. Détermination des Ortho-phosphates	54
II.4.3. Détermination de potassium	55
II.3. CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DE LA MICROALGUE HALOPHILE <i>D. SALINA CULTIVEE</i> DANS LES CONDITIONS DU STRESS SALIN	55
II.3.1. Dosage de la proline dans la biomasse de <i>D. salina</i>	55
II.3.2. Dosage des Chlorophylles et Caroténoïdes dans la biomasse de <i>D. salina</i>	55
II.3.3. Dosage des polysaccharides de <i>D. salina</i>	55
II.4. PREPARATION DES EXTRAITS DES MICROALGUES	56
II.4.1. Hydrolyse de la biomasse des microalgues.....	56
II.4.2. Extraction et caractérisation des polysaccharides	56
II.5. CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES PLANTES	58
II.5.1. Dosage des chlorophylles et les caroténoïdes.....	58
II.5.2. Dosage de l'anthocyanine des plantes	58
II.5.3. Dosage de la proline dans les plantes.....	58
II.5.4. Dosage des sucres totaux dans les plantes	59
II.5.5. Dosage de l'activité enzymatique des ROS-Scavenging enzymes.....	60
II.5.5.1. Extraction des protéines à partir des échantillons de feuilles	60
II.5.5.2. Détermination de la catalase :	60
II.5.5.3. Détermination de la Peroxydase :	60
II.5.5.4. Détermination de l'ascorbate Peroxydase :	60
II.5.6. Dosage des composés phénolique totaux	61
II.6. ETUDE METABOLOMIQUE A BASE DE GC-MS DE LA TOMATE TRAITEE PAR LES POLYSACCHARIDES ET CULTIVEE DANS LES CONDITIONS DU STRESS SALIN	61
II.6.1. Extraction des métabolites	61
II.6.2. Analyse des métabolites	62

RESULTATS ET DISCUSSION	63
CHAPITRE I: ETUDE PHYSIOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE DE SIX MICROALGUES MAROCAINES ET DE LEUR POTENTIEL DE STIMULATION DE LA GERMINATION ET DE LA CROISSANCE DE LA TOMATE.	65
INTRODUCTION	65
I. ETUDE DE LA CROISSANCE DES SOUCHES DE MICROALGUES.....	65
I.1. OPTIMISATION DU MILIEU DE CULTURE.....	66
I.2. OPTIMISATION DES TEMPERATURES DE CULTURE AVEC LE MILIEU OPTIMAL.....	68
II. CRIBLAGE DES SOUCHES DE MICROALGUES POUR LA STIMULATION DE LA GERMINATION ET DE LA CROISSANCE DE LA TOMATE.....	70
II.1. EFFET DES EXTRAITS BRUTS DE LA BIOMASSE HYDROLYSEE DES MICROALGUES SUR LA GERMINATION ET LA CROISSANCE DE LA TOMATE.....	70
II.2. EFFET DES DIFFERENTS EXTRAITS DE MICROALGUES RETENUES SUR LA GERMINATION ET LA CROISSANCE DES PLANTULES DE LA TOMATE	74
III. ETUDE DES MICROALGUES RETENUES	75
III.1. AMELIORATION DU RENDEMENT DES SOUCHES RETENUES PAR L'INJECTION DU GAZ CARBONIQUE (CO ₂) 75	
III.2. CARACTERISATION DE LA BIOMASSE DES SOUCHES RETENUES	77
III.3. CARACTERISATION DES EXTRAITS ACTIFS DES DEUX SOUCHES MICROALGUES SELECTIONNEES	78
III.3.1. <i>Extraction des polysaccharides des microalgues</i>	<i>79</i>
III.3.2. <i>Caractérisation des polysaccharides extraits des microalgues.....</i>	<i>79</i>
IV. CONCLUSION	81
CHAPITRE II : ETUDE DE L'EFFET DES POLYSACCHARIDES EXTRAIT DE LA MICROALGUE SPIRULINA PLATENSIS SUR LA GERMINATION ET LA CROISSANCE DES TROIS PLANTES ETUDIEES.....	84
INTRODUCTION	84
I. EFFET DES POLYSACCHARIDES EXTRAITS DE LA SPIRULINE SUR LA GERMINATION DES GRAINES ET LA CROISSANCE DES PLANTES	84
I.1. EFFET SUR LA GERMINATION DES GRAINES	84
I.2. EFFET SUR LA CROISSANCE DES PLANTES.....	86
I.2.1. <i>Effet sur la croissance de la tomate et du poivron</i>	<i>86</i>
I.2.2. <i>Effet sur la croissance du blé</i>	<i>89</i>
II. CONCLUSION.....	90

CHAPITRE III : ETUDE APPROFONDIE SUR LA REPONSE PHYSIOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE DE LA MICROALGUE *DUNALIELLA SALINA* AU STRESS SALIN ET LE CRIBLAGE DE L'EFFET DES EXTRAITS DE CETTE MICROALGUE SUR L'ATTENUATION DU STRESS SALIN SUR LA GERMINATION ET LA CROISSANCE DES PLANTES ETUDIEES. 93

INTRODUCTION 93

I. ETUDE DE L'EFFET DU STRESS SALIN SUR LA PHYSIOLOGIE ET LA BIOCHIMIE DE LA MICROALGUE HALOPHILE *D. SALINA*..... 93

I.1. EFFET DU STRESS SALIN SUR LA CROISSANCE DE *D. SALINA*..... 93

I.2. REPONSE BIOCHIMIQUE DE LA TOLERANCE DE *D. SALINA* AU STRESS SALIN..... 94

I.2.1. Chlorophylles et caroténoïdes..... 94

*I.2.2. La proline dans la biomasse de *D. salina** 95

*I.2.3. Les exopolysaccharides dans la culture de *D. salina**..... 96

II. EFFET DES EXTRAITS DE *D. SALINA* SUR LA GERMINATION ET LA CROISSANCE DES PLANTES DE BLE 97

II.1. EFFET DE LA BIOMASSE HYDROLYSEE DE *D. SALINA* SUR LA GERMINATION ET LA CROISSANCE DU BLE 98

II.2. EFFET DES MOLECULES PRODUITES PAR *D. SALINA* SUR LA GERMINATION ET LA CROISSANCE DES PLANTULES DU BLE 100

*II.2.1. Effet de la proline exogène et les caroténoïdes extrait de *D. salina* sur la germination du blé* 100

*II.2.2. Effet des exopolysaccharides de *D. salina* sur la germination et la croissance du blé* 101

II.2.3. Effet des exopolysaccharides sur les Chlorophylles, anthocyanine et la proline chez les plantes du blé dans les conditions du stress salin..... 104

*II.2.4. Effet des exopolysaccharides de *D. salina* sur l'activité enzymatiques des plantes du blé dans les conditions du stress salin*..... 105

III. EFFET DES EXOPOLYSACCHARIDES EXTRAITS DE *D. SALINA* SUR LA GERMINATION ET LA CROISSANCE DE LA TOMATE ET LE POIVRON DANS LES CONDITIONS DU STRESS SALIN 108

III.1. EFFET DES EXOPOLYSACCHARIDES DE *D. SALINA* SUR LA TOMATE DANS LES CONDITIONS DU STRESS SALIN 108

III.1.1. Effet sur la germination de la tomate 108

III.1.2. Effet sur la croissance de la tomate dans les conditions du stress salin..... 110

*III.2. Etude de la réponse de la tomate au traitement des exopolysaccharides de *D. salina* dans les conditions de stress salin par l'analyse métabolomique basée sur la GC-MS*..... 113

IV. EFFET DES EXOPOLYSACCHARIDES EXTRAITS DE *D. SALINA* SUR LA REPONSE DU POIVRON DANS DES CONDITIONS DU STRESS SALIN..... 118

IV.1. EFFET SUR LA GERMINATION DU POIVRON DANS LES CONDITIONS DU STRESS SALIN 118

IV.2. EFFET DES EXOPOLYSACCHARIDES DE <i>D. SALINA</i> SUR LA CROISSANCE DU POIVRON.....	119
IV.2.1. Effet sur les paramètres morphologiques du poivron	119
IV.2.2. Effet sur l'anthocyanine et les chlorophylles	120
IV.2.3. Effet sur l'activité enzymatique	121
V. CONCLUSION.....	122
DISCUSSION GENERALE	126
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	131
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	134
ANNEXES :	172
ARTICLES :	178

Liste des abréviations

- APEX : Ascorbate peroxydase
- BBM : Bold's Basal Medium
- BHT : L'hydroxytoluène butylé
- BSA : Bovin sérum albumine
- CAT : Catalase
- DHA : L'acide docosahexaénoïque
- EA: Extrait aqueux
- EBIC : European Biostimulant Industry Council
- EDM: Extrait dichlorométhanique
- EE: Extrait éthanolique
- EPA : Eicosapentaénoïque
- GC-MS: Chromatographie gazeuse -spectrométrie de masse
- GDH : Glutamate déshydrogénase
- GS : Glutamine synthétase
- HA: Hydrolysats acide
- HR: Hydrolyse des résidus
- INRH : Institut National de Recherche Halieutique
- ISR : Résistance systémique induite
- MAScIR : Moroccan Foundation for Advanced Science, Innovation & Research.
- MHDP : Méta-hydroxydiphényle
- NR : Nitrate réductase
- PAL/TAL : Phénylalanine (tyrosine) ammonialyase
- PBR : Photobioréacteur
- POD : Peroxydase
- PS : Polysaccharides
- PUFA : Acides gras polyinsaturés
- ROS : Espèces réactives de l'oxygène
- RT-PCR : Réverse transcriptase-réaction en chaîne par polymérase

SA : Acide salicylique

SAR : Résistance acquise systémique

SH : Substances Humiques

SOD : Superoxydes dismutases

TCA : Acide tricarboxylique

Liste des tableaux

Tableau 1: Diversité des microalgues marines et d'eau douce (Sharma et Rai, 2011).....	6
Tableau 3: Profil biochimique et chimique des espèces microalgues choisies pour ce projet....	15
Tableau 4: Souches microalgues et origines d'isolement.....	47
Tableau 5: Milieux de culture des souches microalgues.....	48
Tableau 6: Biomasse des souches microalgues dans des différentes températures	68
Tableau 7: Caractérisation de la biomasse des souches microalgues retenues	77
Tableau 8: Composition des exopolysaccharides extraits des microalgues	80
Tableau 9: Solutions stock sans NPK pour la préparation des formules équivalentes à BBM.	175

Liste des figures

Figure 1: Diversité morphologique des microalgues (Sumi, 2009)	4
Figure 2 : Quelques exemples de bassins de culture de microalgues.....	11
Figure 3 : Photobioréacteurs de différents types (tubulaire, cylindriques, panels, sachets).....	13
Figure 4 : Cartographie des cibles des principales terminologies identifiées pour les produits de stimulation des plantes.	26
Figure 5 : Image illustre la forme de Chlorella sp.	41
Figure 6: images de Nannochloropsis gaditana.....	41
Figure 7: Image illustre la forme d'Isochrysis galbana.....	42
Figure 8: Photo Phaeodactylum tricornutum.	42
Figure 9 : Images illustrent la forme de Dunaliella salina dans les différentes conditions.....	43
Figure 10: Arthrospira platensis microscope optique	44
Figure 11 : Schéma simplifié d'unPBR BIOSTAT®.....	49
Figure 12 : Image photographique d'un PBR BIOSTAT®	49
Figure 13: Croissance et production en biomasse des 6 souches de microalgues choisies pour cette étude.....	67
Figure 14: Effet des hydrolysats de la biomasse de différentes souches de microalgues sur la vitesse de la germination des graines de la tomate.....	72
Figure 15: Effet des hydrolysats de la biomasse de différentes souches de microalgues à différentes concentrations sur la taille des plantes de la tomate.	73
Figure 16 : Effet des différentes fractions de la biomasse des deux souches microalgues (D.salina, A. platensis) sur la germination et la croissance de la tomate.....	74
<i>Figure 17 : Effet de CO₂ sur la croissance et la production de la biomasse de D.salina.....</i>	<i>76</i>
<i>Figure 18 : Effet de CO₂ sur la croissance et la production de la biomasse de la spiruline.</i>	<i>76</i>
Figure 19: profil lipidique des deux souches microalgues :A. platensis et D.salina.....	78
Figure 20: Polysaccharides extraits à partir de A. platensis et D. salina par différentes méthodes.	79
<i>Figure 21: Effet des polysaccharides extraits de A.platensis à 0,05g/L sur le taux et la vitesse de la germination des graines des: blé (a), tomate (b), poivron (c).</i>	<i>85</i>

<i>Figure 22: Effet des polysaccharides sur la croissance des plantes de la tomate (Solanum lycopersicum) et de poivron (Capsicum annuum).</i>	87
Figure 23 : Photo illustre l'effet des polysaccharides sur la croissance des plantes de la tomate (Solanum lycopersicum) et de poivron (Capsicum annuum)......	88
Figure 24: Effet des polysaccharides extraits d'A.platensis sur la taille et le poids du blé.	90
Figure 25: la croissance de D. salina cultivée dans le milieu Walne avec différentes concentrations de NaCl (0.5, 1, 2 and 4M) at 25°C, agitation 140rpm et une lumière continue de 5000lux.	94
Figure 26: Taux de la Chlorophylle et les caroténoïdes dans la biomasse de D. salina.	95
Figure 27: Accumulation de la Proline dans la biomasse de D. salina.	96
<i>Figure 28: La production des exopolysaccharides par D. salina.</i>	97
<i>Figure 29: Effet des hydrolysats de D. salina cultivées dans différentes concentrations de salinité (0.5, 1, 2, 4M NaCl) sur le taux de la germination du blé et la taille des plantules dans des conditions de stress salin (3 et 6g/L NaCl).</i>	99
Figure 30 : Effet des molécules produites par D. salina en réponse au stress salin sur la germination du blé.	101
Figure 31: Effet de 0,1g/L des exopolysaccharides libérés par D. salina dans le milieu en réponse au stress salin sur la germination et la croissance des plantules du blé.	103
Figure 32 : Effet de 0,1g/L des exopolysaccharides extraits de D. salina sur l'anthocyanine, chlorophylles et la proline des plantes du blé cultivées dans des conditions du stress salin (3 et 6g/L de NaCl).	105
Figure 33: Effet des exopolysaccharides extraits de D.salina (0,1g/L) sur l'activité des ROS-scavenging enzymes des plantes du blé.	107
Figure 34 : Effet des polysaccharides de D.salina sur la germination des graines de la tomate dans les conditions du stress salin (3 et 6g/L NaCl).	109
Figure 35 : Effet des polysaccharides extrait de D. salina sur La croissance de la tomate.	111
Figure 36: L'anthocyanine et les chlorophylles des plantes de la tomate cultivées dans des conditions du stress salin (3 et 6g/L de NaCl) et traitées avec 0,1g/L d'exopolysaccharides de D. salina.	112
Figure 37: L'activité des enzymes ROS-Scavenging enzymes chez les plantes de la tomate cultivées dans les conditions du stress salin et traitées avec 0,1g/L des exopolysaccharides de D .salina.	113
Figure 38: Effet des polysaccharides de D. salina sur le profile lipidique.	115

Figure 39 : Effet des polysaccharides de <i>D. salina</i> sur les métabolites antioxydantes détectées par l'analyse de GC-MS dans l'extrait chloroformique de la tomate.....	117
Figure 40: Evaluation de l'effet des polysaccharides de <i>D. salina</i> sur la vitesse et le pourcentage de germination des graines de poivron dans les conditions du stress salin (3 et 6g/L NaCl). ..	119
Figure 41 : Taille et poids des paramètres morphologiques des plantes de poivron cultivées dans des concentrations de NaCl (3g/L et 6g/L) et traitées avec 0,1g/L des exopolysaccharides de <i>D. salina</i>	120
<i>Figure 42: L'anthocyanine et les chlorophylles des plantes du poivron cultivées dans des conditions du stress salin (3 et 6g/L de NaCl) et traitées avec 0,1g/L des exopolysaccharides extraits de D. salina.</i>	<i>121</i>
Figure 43: L'activité des enzymes du stress chez les plantes de poivron traitées par les polysaccharides de <i>D. salina</i>	122

INTRODUCTION

Le Maroc dispose de deux façades maritimes, avec plus de 3.500 km de Côtes dont 500Km sur la Méditerranée et 3.000 Km sur l'Atlantique. La variété des conditions climatiques et géologiques de cette étendue marine et océanique a donné une biodiversité écologique extrêmement riche, notamment la diversité en microorganismes marins.

Les organismes marins tels que les bactéries, les microalgues et les algues constituent environ la moitié de la biodiversité mondiale. Les océans représentent ainsi une énorme source de composés fonctionnels produits par ces systèmes biologiques. La complexité des milieux marins et leur compétitivité, poussent les organismes de ces milieux à produire une large gamme de molécules uniques qui sont essentielles pour leur survie et leur adaptations (**Ahmadis et al., 2015; Chen et al., 2016; Qiet et al., 2017**). Parmi les molécules les plus documentés on retrouve, les acides gras polyinsaturés, les vitamines, les antioxydants (**Rocha de Souza et al., 2007**), les enzymes et les peptides bioactifs (**Shahidi et Ambigaipalan, 2015**).

Les microalgues sont des microorganismes photosynthétiques de petite taille (0.6 à 200 µm), avec un nombre d'espèces de microalgues estimé entre 200 000 et un million, et qui sont présentes dans des écosystèmes tels que les océans, les rivières et les lacs (**Cadoret et al., 2008**). Une diversité biochimique est liée à chaque espèce de microalgues et dont certaines renferment des molécules uniques, que l'on ne retrouve nulle part ailleurs telle que la phycocyanine produite par *Arthrospira platensis* et *Arthrospira maxima* (**Lee et al., 2017**). Pas plus de 10% de ces espèces sont identifiées et décrites par les scientifiques, mais peu d'espèces sont cultivées à l'échelle industrielle. Cette diversité biochimique constitue une source très prometteuse pour le développement des solutions biologiques, qui permettent la réduction de l'utilisation des produits chimiques dans l'agriculture et ce sans affecter le rendement.

Diverses substances biologiques ont la capacité de provoquer des réactions métaboliques chez la plante, favorisant leur croissance et améliorant leur réponse au stress (**du Jardin, 2012**). Ces substances biostimulantes ont pour caractéristique commune de reposer sur un mode d'action passant par la stimulation de processus biologiques au niveau du sol et/ou de la plante (par exemple : stimulation de la défense et la croissance des plantes ou l'absorption des nutriments,...) (**Berlyn et Russo 1990; Nardi et al., 2006; Petrozza et al. 2013a, 2013b**).

L'utilisation des algues dans le domaine de l'agriculture a été basée principalement sur l'utilisation des macroalgues comme fertilisants permettant, l'augmentation de la rétention d'eau

et l'amélioration de la composition minérale au niveau du sol, l'amélioration de la croissance (**Rengasamy et al., 2017**) et confèrent même aux plantes la résistance aux stress abiotiques (**Battacharyya et al., 2015**). Malgré le potentiel biochimique des macroalgues dans l'amélioration de la productivité et la protection des plantes, ces organismes ont subi une dégradation à cause des problèmes environnementaux dus aux changements climatiques et la mauvaise exploitation de ces ressources naturelles, ajoutant à cela, la difficulté de la culture de ces organismes qui nécessite beaucoup d'espace et de compétences techniques.

Par ailleurs, les microalgues, avec leur grande biodiversité, sont faciles à cultiver. Autant plus qu'elles présentent la possibilité d'orienter leur métabolisme vers la production des molécules bien spécifiques par l'ajout des additifs et par l'application des stress sur la culture de ces microorganismes. Les microalgues ont une biochimie similaire voire plus importante que celle des macroalgues, ce qui représente une source renouvelable en substances organiques ou métabolites secondaires extracellulaires bénéfiques aux cultures agricoles. De ce fait, les molécules produites par certaines espèces de microalgues et cyanobactéries, peuvent être utilisées comme biostimulants des plantes (**Mishalak et al., 2017**). La tendance future semble être l'utilisation de l'activité biologique des extraits de microalgues comme un biostimulant des différentes voies métaboliques de la plante liées à la croissance, la nutrition et la tolérance aux stress biotiques et abiotiques (**Aly et al., 2008, Borowitzka 1995; Faheed et Abd-El Fattah, 2008; Ismail et al., 2011; Metting 1996; Ördög et al., 1996 ; Pulz et Gross, 2004**). Les microalgues pourront être une solution alternative durable pour la réduction de l'utilisation des intrants chimiques en production végétale, et donc faire face aux problèmes environnementaux liés à ces produits (**Clunies-Ross et Hildyard, 1992, Kourgialas et al., 2017**).

Les cultures au Maroc subissent beaucoup des dégâts à cause des problèmes environnementaux liées aux stress biotiques et abiotiques tel que le stress hydrique et le stress salin. Ainsi l'utilisation non contrôlée des intrants chimiques pour l'amélioration et la protection des cultures.

A titre d'exemple, les céréales représentent l'un des principaux secteurs de production agricole au Maroc. Elles représentent 15 à 20 % du PIB et génèrent 40% d'emplois. La superficie annuellement emblavée est en moyenne aux alentours de 5 millions d'hectares soit 70% de la superficie agricole utile. Les cultures céréalières les plus importantes sont le blé tendre (2 Mha), le blé dur (1.9 Mha) et l'orge (1 Mha). La production céréalière est située essentiellement en

bour, influencée par une pluviométrie de plus en plus rare variant dans l'espace et dans le temps. L'essentiel de la production provient des agro écosystèmes sub- humides et semi arides.

La salinisation constitue une menace réelle pour la sécurité alimentaire mondiale du fait qu'elle abaisse les rendements des cultures et peut détériorer les terres de façon irrémédiable. En effet, chaque minute, trois hectares de terres arables sont détériorés d'une manière souvent irréversible à cause de la salinisation des sols. Ce phénomène progresse rapidement dans le monde et concerne un cinquième des terres irriguées FAO (2002).

Les zones les plus menacées sont celles à climat aride à semi-aride. Plus l'aridité est forte, plus l'irrigation est incontournable à la culture et plus son usage est risqué (Ruellan et coll. 2008). Le Maroc, exemple de pays de climat aride à semi- arides, est menacé par la salinisation des sols. Plus que 5 % du Maroc sont déjà affectés par la salinisation à différents degrés (**Antipolis, 2003**).

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation des microalgues marocaines pour le développement des biostimulants de plantes qui pourront activer les différentes voies métaboliques liées à la croissance et le développement des plantes, ainsi à la tolérance des plantes contre les stress abiotiques tel que le stress salin. Très peu de travaux ont porté sur la valorisation des microalgues et leurs substances dans l'amélioration de la croissance et la tolérance des plantes au stress salin. Par ailleurs, jusqu'à nos jours aucun travail similaire n'a été réalisé au Maroc.



ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les microalgues et leurs applications

Les microalgues sont des microorganismes photosynthétiques procaryotes ou eucaryotes qui peuvent croître rapidement et vivre dans des conditions difficiles en raison de leur structure. D'une taille de l'ordre des micromètres, ces microorganismes sont considérés comme les premiers producteurs de l'oxygène sur la terre. Elles peuvent être procaryotes (cyanobactéries) ou eucaryotes (microalgues), selon la présence ou non d'un noyau cellulaire. Les microalgues sont présentes dans tous les écosystèmes existants, non seulement aquatiques, mais aussi terrestres, représentant une grande variété d'espèces vivant dans une large gamme de conditions environnementales.

Ces microorganismes produisent, de l'oxygène, des glucides, des lipides et des protéines, avec une structure cellulaire constituée d'un noyau et une membrane plasmique contenant des organites essentiels à leur fonctionnement tels que les chloroplastes, les amyloplastes, les oléoplastes et les mitochondries. Elles contiennent trois principaux types de pigments qui sont les chlorophylles, les caroténoïdes et les phyco-biliprotéines. La forme de ces microorganismes est très variable : sphériques (*Porphyridium*), en forme de croissant (*Clostridium*), de spirale (*Arthrospira*), de gouttelette (*Chlamydomonas*) et même d'étoile (*Staurastrum*) (figure 1).

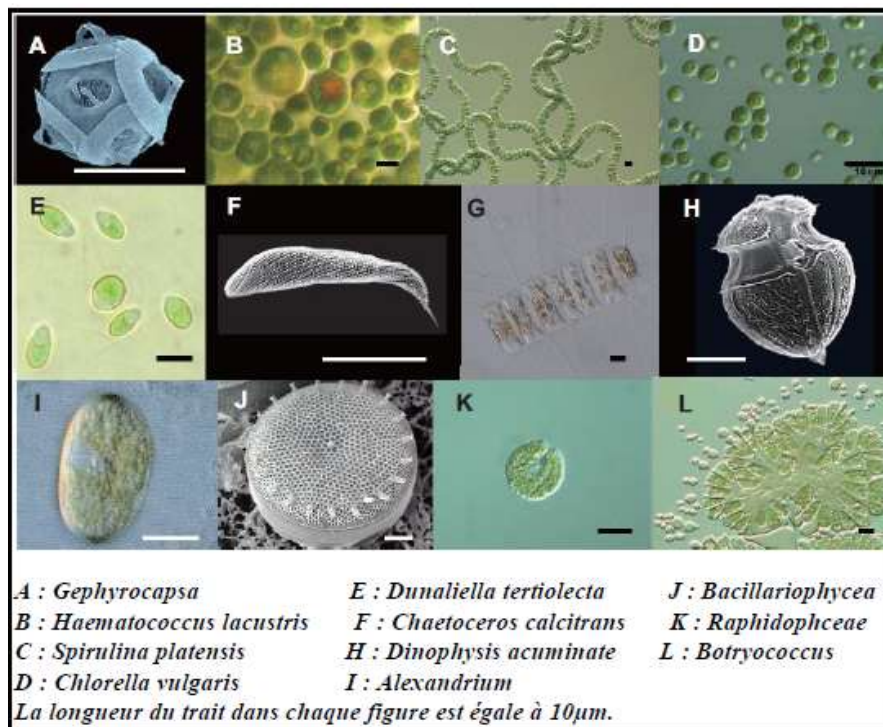


Figure 1: Diversité morphologique des microalgues (Sumi, 2009)

D'un point de vue métabolisme nutritionnel, les microalgues sont majoritairement « photo-autotrophes » mais elles peuvent être également « hétérotrophes » ou « mixotrophes ». L'autotrophie est le modèle plus utilisé dans l'industrie des microalgues à cause de leur simplicité de culture. Ce choix permet de réutiliser le carbone inorganique ce qui ouvre la possibilité de combiner la culture des microalgues avec la bio-séquestration du dioxyde carbone. L'autotrophie reste le mode optimal pour la culture des microalgues dans les systèmes ouverts dans les climats favorables pour la culture de ces microorganismes, tel que le climat du Maroc principalement dans le sud du Royaume.

Les microalgues se caractérisent par une petite taille de l'ordre du micromètre, un temps de génération rapide et une biodiversité taxonomique, biochimique ouvrant les voies à une diversité d'applications biotechnologiques. En effet, elles constituent un vivier pour de nouvelles applications technologiques et économiques. Ces microorganismes sont caractérisés par une diversité biochimique très importante, ouvrant la possibilité de produire des biomolécules à haute valeur ajoutée pour les différentes applications telles que la santé, l'agriculture, la cosmétique, l'alimentation humaine ou animale, ou encore l'environnement et les énergies renouvelables.

I.1. Classification taxonomique des microalgues

Les microalgues sont des microorganismes d'une diversité extrêmement hétérogène rassemblée autour d'une cohérence physiologique : la photosynthèse oxygénique (**Andersen, 1992**). Un nombre estimatif de plusieurs centaines de milliers à plusieurs millions d'espèces dont 47 000 espèces sont décrites (**Sharma and Rai, 2011**). Cette diversité dépasse de loin celle des plantes supérieures qui est de 400 000 espèces. La classification de ces microorganismes est très complexe (Tableau 1) et la taxonomie reste toujours mobile, surtout après l'utilisation des techniques de phylogénie moléculaire.

Tableau 1: Diversité des microalgues marines et d'eau douce (**Sharma et Rai, 2011**)

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

Les microalgues sont classées selon leurs propriétés morphologiques (**Fogg, 1953**), leur cycle de vie, la nature chimique des produits photosynthétiques de réserve (produit d'accumulation intracellulaire), l'organisation de leurs membranes photosynthétiques (**Carlsson et al., 2007**) ou leur pigmentation.

On distingue principalement deux grands groupes de microalgues :

- **Les procaryotes :**

- ✓ *Les Cyanophycées* : appelées également cyanobactéries, sont des microalgues procaryotes de coloration bleue verte (**Lechevalieret al., 1977**). Elles sont représentées par 2000 espèces approximativement (**Alcaine, 2010**) pouvant être divisées en 150 genres. Ces microorganismes sont répandus dans toutes les variétés d'habitats aquatiques. Les espèces les plus connues sont *Spirulina (Arthrospira) platensis*, *Nostoc commune* et *Aphanizomenom flos-aquae* (**Pulz et al, 2004**).

- **Les eucaryotes :**

- ✓ Diatomées : ou bien « *bacillariophycées* », ce sont des microorganismes photosynthétiques qui constituent le groupe dominant du règne des microalgues

avec plus de 100 000 espèces connues. La classe *Bacillariophycée* constitue des espèces d'eau douce et marines, et sont principalement unicellulaires, bien que certains soient coloniales. Une caractéristique clé de cette classe est la production d'un frustule siliceux recouvrant la cellule. Les diatomées centrales *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros muelleri* et *Thalassiosira pseudonana* sont les plus connues de cette classe.

- ✓ *Les Chlorophycées* : ce sont des microalgues vertes qui colonisent une grande variété d'habitats. Elles sont très abondantes dans les eaux douces. Ces microorganismes présentent des différentes formes (**Pulz et al., 2004**). On dénombre actuellement 8 000 espèces, dont 1 000 sont des chlorophycées marines (**Alcaine, 2010**). Ces microalgues sont d'origine marine, d'eau douce ou même terrestre et comprennent les unicellulaires et multicellulaires possédant des chlorophylles *a* et *b* dans un seul chloroplaste entouré par deux membranes. *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina* et *Haematococcus pluvialis* sont les espèces de microalgues unicellulaires les plus connues dans cette classe (**Leliaert et al., 2012**).
- ✓ *Les Chrysophycées* : ce sont des algues dorées qui se répandent essentiellement dans les eaux douces. On répertorie environ 1 000 espèces avec des caractéristiques similaires à celles des diatomées du point de vue pigmentation et structure biochimique (**Alcaine, 2010**).
- ✓ *Les Euglenophycées* : elles sont répandues dans les eaux saumâtres et douces. On compte plus de 800 espèces qui présentent des réserves constituées essentiellement d'une substance glucidique, le "paramylon", et d'huile.
- ✓ *Les Eustigmatophycées*, caractérisées par la chlorophylle *a*, et non *c* comme les autres straménopiles. Elles sont unicellulaires et peuvent être trouvées dans les environnements marins, d'eau douce. Le genre *Nannochloropsis* est la plus connue de cette classe, contient cinq espèces, dont uniquement *N. limnetica* se rencontre en eau douce (**Suda et al., 2002**). Ces cellules sont généralement rondes à ovales, non mobiles contenant une seule mitochondrie.
- ✓ *Les Rhodophycées* : ce sont des algues de pigmentation rouge qui comprennent près de 400 espèces présentant dans la majorité des cas un métabolisme photo-autotrophe (**Lechevalier et al., 1977**).
- ✓ *Les Rhodophycées* constituent principalement des espèces multicellulaires marines, tandis que les espèces d'eau douce sont rarement unicellulaires. L'espèce la plus

connue de ce phylum est la *Porphyridium cruentum*. Les cellules sont généralement sphériques avec un noyau excentrique et un seul grand chloroplaste entouré de deux membranes et un seul pyrenoïde central (**Gantt et Conti, 1965**). Les phycobilisomes, contenant de la phycocyanine et la phycoérythrine, recouvrent le côté stromal des thylakoïdes. Les cellules sont entourées de mucilages fibrillaires et diffus dont l'épaisseur augmente avec l'âge et se compose d'hydrates de carbone dont laxylose est l'un des principaux sucres (**Gantt et Conti, 1965**). *Rhodella reticulata* est une autre espèce de ce phylum (**Deason et al., 1983**) caractérisée par une pyrenoïde central traversé par des thylakoïdes, une caractéristique distinctive des espèces du genre (**Deason et al., 1983**).

I.2. Production mondiale et marché des microalgues

Les microalgues constituent un potentiel aussi bien pour la recherche que pour l'industrie. Bien qu'un certain challenges technologiques restent à résoudre tels la technologie de récolte qui jusqu'à maintenant reste une étape qui nécessite beaucoup d'énergie, les microalgues s'affirment comme bio-ressource très prometteuse pour plusieurs applications telles que la santé, l'énergie, l'environnement, l'agriculture, etc.

Le marché mondial des produits issus de microalgues évolue favorablement, même s'il est considéré comme un marché émergent. La production mondiale des microalgues a connu une croissance accrue durant les dix dernières années, pour atteindre 35 000 tonnes en 2015 (**Rapport de l'étude de marché Oilgae, 2015**).

L'Asie est le premier producteur de micro-algues, avec 50% de la production mondiale. Les principaux autres pays producteurs sont les USA, le Chili, l'Argentine, la Palestine occupée et l'Australie. En Europe, l'Allemagne et les Pays-Bas sont les premiers producteurs avec environ 50 tonnes chaque année (**Person J., LIVRE TURQUOISE Algues, filières du futur, 2011**).

La totalité de la production industrielle concerne uniquement une douzaine d'espèces de microalgues dont les principales sont :

- ✓ *Arthrospira ou Spiruline* (cyanobactérie), la plus cultivée au monde (5 kt/an)
- ✓ *Chlorella vulgaris*
- ✓ *Dunaliella salina*
- ✓ *Aphanizomenon flos-aquae* (cyanobactérie)
- ✓ *Haematococcus pluvialis*

- ✓ *Cryptocodinium cohnii* (absence de chloroplaste)
- ✓ *Ulkenia sp.*
- ✓ *Ondotella aurita* (diatomée)
- ✓ *Schizochytrium* (protiste hétérotrophe à la frontière avec les champignons)
- ✓ *Nannochloropsis*
- ✓ *Euglena*

Une vingtaine d'autres espèces sont également étudiées, sans pour l'instant atteindre des volumes de production significatifs, parmi ces espèces on peut notamment citer : *Botryococcus braunii*, *Nannochloris*, *Scenedesmus*, *Tetraselmis*, *Cylindrotheca*, *Isochrysis*, etc.

I.3. Marché et produits des microalgues dans l'agriculture

Les extraits d'algues marines (macroalgues) sont depuis longtemps utilisés en agriculture, comme améliorants pour le sol ou stimulants de la croissance des plantes. Les algues marines contiennent des composés bioactifs tels que les acides gras insaturés, les acides aminés, les polysaccharides, l'acide alginique pour certaines espèces, les vitamines, les pigments, les minéraux, les phytohormones et les glucides. Cependant, les macroalgues ont beaucoup de challenges, vu la difficulté de la culture à grande échelle, du fait que les macroalgues peuvent accumuler des métaux lourds et impactent la biodiversité liée à l'exploitation directe.

Ces mêmes composés sont présents et peuvent être apportés par les espèces de microalgues, relativement avec les mêmes proportions. D'autant plus que des produits fertilisants et biostimulants à base de microalgues, gagnent peu à peu le marché.

A titre d'exemple, l'institut chinois « Soley biotechnology institute » commercialise différentes mixtures de microalgues suivantes : *Spirulina platensis*, *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella sp.*, *Chlorella protothecoides*, *Nannochloropsis sp.*, *Chlorella sorokiniana*. Ces fertilisants de sol 100% organiques et selon la mixture, offrent des ratios NPK différents : 10-2-4, 15-5-10, 20-20-20, 3-5-3, 5-2-1, 8-12-24.

BioAlgal Marine, un spin off de l'université d'Almeria a développé, en 2009, un lysat liquide de spiruline, véritable concentré d'acides aminés, de polysaccharides, de phytohormones, d'oligoéléments et d'antioxydants. Ce fertilisant naturel, stimulant des racines et de la résistance des plantes, a été testé biologiquement sur des fraisiers et des oliviers entre autres, de la région d'Almeria. Le produit serait toujours en phase d'étude ou d'amélioration.

Peu de brevets sont déposés dans ce domaine, l'exemple d'un brevet japonais déposé en 1990, intitulé « Fertilizer for agriculture and horticulture », décrit la préparation d'un engrais favorisant la croissance de divers types de plantes à différents stades par le biais notamment, d'extrait de procaryotes photosynthétiques. L'extrait est sous forme condensée ou diluée ou dans un état de poudre (préparée par séchage, lyophilisation, ou séchage par atomisation, etc.), en mélange avec d'autres ingrédients de l'engrais. Les procaryotes photosynthétiques utilisés sont *Chlorogleopsis*, *Dermocarpa*, la spiruline, *Anabena*, *Halobacterium*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Photobacteria*.

Durant les dernières années, plusieurs études se sont portées, sur l'utilisation de microalgues comme bio-fertilisant. Certaines ont pu démontrer l'efficacité de lysats liquide ou extraits séchés de microalgues, sur la croissance de certaines plantes, ainsi qu'un effet biostimulant et bio-protecteur.

I.4. Technologies de Culture des microalgues

Les systèmes de culture d'algues sont généralement classés en fonction de leurs caractéristiques techniques, la productivité, l'application industrielle, l'espèce elle-même, les conditions climatiques de la zone choisie pour la mise en place du système de culture et le coût de l'investissement. Selon ces critères, deux types de technologies ont été développées dans les dernières années : les systèmes ouverts et les photo-bioréacteurs.

I.4.1. Bassins ouverts

Ce sont des systèmes classiques de conception simple et robuste qui ressemblent au milieu naturel de croissance des microalgues, impliquant souvent des tailles importantes (jusqu'à 300 ha.). Cependant, la production des microalgues dans ces systèmes présente de nombreux inconvénients liés à l'absence de contrôle des conditions de culture, aux problèmes de contamination par d'autres organismes (bactéries, champignons, levures...). Pour cela, une sélection des souches microalgues extremophiles qui vivent dans des conditions extrêmes (pH très basique, des salinités élevées,...etc.) est apparu comme solution pour éviter les contaminations.

Les bassins ouverts (figure 2) sont la première technologie pour la culture de masse de microalgues au niveau mondial. Ce système de culture se présente sous forme de bassins en plein air ou sous serre avec des niveaux d'eau de 0,2 à 0,5 m selon le type d'espèce afin d'assurer une exposition suffisante à la lumière naturelle. Les étangs sont principalement construits en

béton ou en plastique. La taille varie du petit modèle expérimental (1,4 m³) au très gros volume industriel (4 000 m³).



Figure 2: Quelques exemples de bassins de culture de microalgues.

(<http://microbioengineering.com/home/>. <http://www.diplomatie.gouv.fr>)

Les bassins varient par leur forme, le type de matériaux utilisés, le système de mélange du milieu. Plusieurs familles de bassin existent :

- Les bassins naturels (Open ponds) : sont souvent utilisés pour la culture de *Dunaliella salina* ou pour la Spiruline. Ils ont en général une faible productivité (< 1 g/m²/Jour).

- Les bassins circulaires : sont des bassins agités par des bras rotatifs placés au centre des bassins. C'est des systèmes qui nécessitent un fort investissement en matériel et consomment beaucoup d'énergie. Ils sont principalement utilisés en Asie pour la culture de Chlorelles.
- Les raceways : L'agitation des cultures s'effectue grâce à des roues à aubes. La productivité de ces bassins est d'environ $20-25 \text{ g.m}^{-2}\text{j}^{-1}$, pour une concentration cellulaire inférieure à $0,6\text{g.L}^{-1}$.

I.4.2. Photo-bioréacteurs

Un photo-bioréacteur (figure 3) est défini comme un système clos à l'intérieur duquel se déroulent, en présence d'énergie lumineuse, des interactions biologiques que l'on cherche à contrôler en maîtrisant les conditions de culture. En son sein, a lieu une réaction biochimique de photosynthèse dans le but de produire de la biomasse végétale à partir de microalgues, de CO_2 et de lumière. La notion de photobioréacteur date déjà de quelques décennies. Les premiers systèmes clos sont apparus à la fin des années 40, mais faute de moyens techniques leur développement a été interrompu et les cultures ont continué à être réalisées en bassins rudimentaires. Dans les années 80, les recherches ont repris activement et de nombreux photobioréacteurs ont été réalisés et expérimentés avec des formes géométriques diverses.

Deux familles de photobioréacteurs se distinguent du point de vue géométrique : les photobioréacteurs plats (géométrie plane) et les photobioréacteurs tubulaires (géométrie cylindrique). Ils permettent la culture des souches de microalgues sensibles qui ne pourraient pas faire face aux microorganismes polluants installés dans les systèmes ouverts. Concernant les productivités, elles sont sensiblement plus élevées et peuvent être obtenues par un ajustement des conditions optimales de culture ; par exemple, le cas des molécules destinées à la fabrication de produits de beauté ou les soins de santé qui sont produites en respectant les normes de pureté et sûreté du produit. Ainsi, les photobioréacteurs fermés sont de plus en plus utilisés pour la production des molécules pharmaceutiques en suivant les lignes directrices relatives aux bonnes pratiques de fabrication (BPF). L'exploitation des microalgues en cosmétique et pharmaceutique n'est envisageable que si l'on peut les produire de manière fiable dans des conditions de stérilité, de reproductibilité et de coût satisfaisant, un meilleur rendement, et une stabilité à l'échelle industrielle.

Les photobioréacteurs permettent la reproductibilité des conditions de culture ainsi qu'une forte concentration cellulaire et une forte productivité. Les bassins ont une faible productivité ($0,05$ à $0,1 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$) et de faibles concentrations cellulaires ($< 1 \text{ g.L}^{-1}$) par rapport aux photobioréacteurs (concentration supérieur à 1 g.L^{-1} et une productivité supérieur à $0,8$ à $1,3 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{J}^{-1}$) (**Chisti, 2007**). Cependant, les coûts d'installation et de fonctionnement des photobioréacteurs, sont beaucoup plus élevés que ceux des systèmes de bassins ouverts. Les photobioréacteurs existent sous de nombreuses formes (*Figure 3*) :



Figure 3 : Photobioréacteurs de différents types (tubulaire, cylindriques, panels, sachets).
<http://www.bioazul.com/fr/portfolio/algatec-ii/>. <http://algue-production-energie.e-monsite.com>

- Les photobioréacteurs plans (panels) : ce sont des réacteurs qui se composent de deux panneaux parallèles transparents de faibles épaisseurs ($< 10 \text{ cm}$), et entre lesquels réside une couche de culture d'une profondeur de quelques centimètres. Les panels sont disposés verticalement ou horizontalement avec une certaine inclinaison pour maximiser l'intensité lumineuse incidente, cela permet de réduire le chemin lumineux. La

circulation s'effectue par pompe ou injection d'air. La productivité de ce système va de 24 à 50 g.m⁻².j⁻¹.

- Les photobioréacteurs sous forme de sacs plastiques (Plastics bags) : Ces photobioréacteurs sont des gaines en plastique.
- Les photobioréacteurs cylindriques se composent d'un ou plusieurs tubes transparents, de diamètres et longueurs variables, de configurations diverses au sein desquels circule la culture.
- Les photo-bioréacteurs tubulaires : ce sont des systèmes de culture constitués de tubes transparents (verre ou plastique) d'un diamètre de 0,1 m maximum pour permettre la disponibilité de la lumière au centre de la culture. Ces photo-bioréacteurs se composent d'une succession de rangées de tubes, alignés de manière horizontale ou verticale par rapport au sol. Ils peuvent être éclairés par lumière artificielle ou simplement exposés à la lumière du soleil.

I.5. Potentiel chimique et biochimique des microalgues sélectionnées

La diversité des microalgues est considérée comme une source prometteuse de composés bioactifs comme les caroténoïdes, les acides gras, les stérols, les acides aminés, les phycobilines, les polypeptides, les pectines, les composés halogénés, les toxines, etc (**Borowitzka, 2013; Leu and Boussiba, 2014 ; Milledge, 2011**). Les microalgues contiennent généralement une importante teneur en protéines présentant un profil complet en acides aminés et possèdent, par conséquent, une excellente qualité nutritionnelle. Certaines microalgues contiennent jusqu'à 60% de protéines. La teneur moyenne en lipides dans les microalgues varie entre 1% et 40% et, selon les conditions de croissance, ce taux peut augmenter jusqu'à 80% du poids sec. Les lipides des microalgues sont généralement composés de triglycérides ou d'esters d'acides gras comportant de 12 à 26 carbones. Les lipides les plus importants sont les acides gras polyinsaturés essentiels tels que l'acide linoléique, l'acide eicosapentaénoïque et l'acide docosahexaénoïque (**Peterson et al., 2008**). Actuellement, les microalgues sont la principale source durable de caroténoïdes commercialisés et d'acides gras oméga-3 (**Borowitzka, 2013; Leu et Boussiba, 2014**). De plus, les microalgues se sont révélées être des hôtes rentables et sûrs pour exprimer un large éventail de protéines recombinantes, y compris des agents thérapeutiques humains et animaux et des enzymes industrielles (**Specht et al., 2010; Rosales-Mendoza et al., 2012; Scranton et al., 2015**). Les microalgues possèdent aussi une richesse incomparable d'éléments minéraux : calcium, sodium, magnésium, potassium, phosphore,

silice, iode, fer, zinc, manganèse, etc. Au-delà des trois grandes catégories de composantes, les microalgues contiennent aussi des pigments associés à la photosynthèse (chlorophylle, E-carotène, lutéine, etc.) et des polysaccharides (tableau 3).

Le tableau 3 décrit à titre d'exemple le profil biochimique, le contenu NPK et les minéraux des différents genres et souches choisies (5 souches marines et une souche d'eaux douces).

Tableau 2: Profil biochimique et chimique des espèces microalgues choisies pour ce projet

Souche	Protéines en % poids sec	Glucides en % poids sec	Lipides en % poids sec	N%	P%	K %	Autres Minéraux (par rapport à la biomasse)	Références
---------------	---	--	---	-----------	-----------	----------------	--	-------------------

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

<i>Arthrospira platensis</i>	46-65	8-18	4- 16	6.7 - 10	2.47	1.1 4	Cr 0.0003 % Ca 1% Cu 0.0012 % Fe 0.15 % Mg 0.3 % Mg 0.003 % Na 0.4 % Zn 0.003 % Ca 1% Fe 0.15% Zn 0.003% Cu 1.2% Na 0.6 %	Becker, 2004 Hendrickson, 1989 by Kupras et al., 2003 Mata et al. 2010 Manuel Jean Paul Jourdan 2001 Kulpys 2009
<i>Chlorella sp</i>	55	9	25	8				Biller et al., 2011
<i>Nannochloropsis sp.</i>	28.8-53	19.8- 37.6	11-68.5	4,6-8,4		0.5	Ca 0.9%, Na 0.6%, Mg 0.3%, Zn 0.1%, Fe 0.1%, Mn 0.003%, Cu 0.035%	Olofsson, 2012 Chisti, 2007 Gerde et al. 2013 Banerjee et al. 2011 Reboloso-Fuentes MM 2001
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	16.7-54	24	6.6-57	0.8-8,6	0.2	1.7	Ca 1.9%, Na 1.4, S 1%, Mg 0.5%, Zn 0.3%, Mn 0.03%, Cu 0.008%	Reboloso-fuentes 2001 Gatenby et al, 2013 Chisti, 2007 Skrede et al, 2011 Mata et al. 2010 T.R Parsons et al. 1961
<i>Dunaliella salina</i>	25.6-57	31.6-40	6-34	4-9.12		3.3		Um and Kim, 2009; Sydney et al., 2010 Parsons et al. 1961
<i>Isochrysis sp.</i>	12.4- 37	29	33	1,9-5,9				Sanchez et al. 2000 Mata et al. 2010

I.6. Applications des microalgues

Les microalgues sont des microorganismes photosynthétiques capables de convertir l'énergie solaire en énergie chimique, et produisent de nombreux composés bioactifs qui peuvent être exploités commercialement. Le potentiel biochimique des microalgues pour la production de composés à haute valeur ajoutée ou pour une utilisation énergétique est largement reconnue, en

raison de leur utilisation efficace par rapport aux plantes supérieures. Les microalgues peuvent être utilisées pour produire une large gamme de substances telles que des protéines, des lipides, des glucides, des caroténoïdes, des vitamines,...etc. Ces substances pourront être utilisées dans le domaine de la santé, l'alimentation humaine et animale, la cosmétique, l'agriculture, l'environnement et l'énergie.

Dans les dernières années, les microalgues ont connu une révolution industrielle au niveau mondial dans plusieurs applications. Les composés d'intérêt identifiés sont essentiellement les lipides, les vitamines, les polysaccharides, les protéines, les pigments, les antioxydants et d'autres composants cellulaires.

Actuellement, plusieurs produits commerciaux à base de microalgues ont été mis sur le marché tels que les aliments humains et animaux, en raison de leur valeur nutritive et de leur composition chimique. En plus de l'alimentation, les microalgues ont été à la base de plusieurs produits commercialisés en cosmétique, en agriculture, pour la production d'énergie et pour l'environnement.

I.6.1. Application alimentaire

Le potentiel biochimique des microalgues est un atout important pour leur exploitation dans le domaine de la nutrition humaine et même animale. En effet, les molécules produites par les microalgues ont montré des activités biologiques qui sont appliquées dans la prévention, la gestion et le traitement des problèmes de santé, y compris les maladies cardiovasculaires (**Ejike et al., 2016**). L'utilisation de peptides bioactifs extraits des microalgues comme aliments fonctionnels est une piste d'innovation alimentaire qui se développe rapidement, vu leur effet positif sur la santé humaine surtout sur l'hypertension, le stress oxydatif, le cancer, le diabète, l'inflammation, et les désordres immunitaires (**Udenigwe & Aluko, 2012**).

Plusieurs espèces de microalgues sont reconnues comme sources de molécules d'intérêt comme les protéines, les PUFA's, les molécules antioxydantes...etc. Actuellement, deux espèces de microalgues, *Spirulina* et *Chlorella*, dominent le marché mondial des microalgues. Le taux de protéine élevé (entre 12 et 65 % de la matière sèche d'après **Coutteau, 1996**), de plusieurs espèces de microalgues est une des principales raisons pour les classer comme source prometteuse de protéines (**Cornet, 1998 ; Fox, 1999, Soletto et al., 2005**).

A côté de l'alimentation humaine, les microalgues sont également incorporées dans l'alimentation des poissons, des mollusques, des animaux domestiques ou d'élevage. Environ, 20% de la production mondiale de microalgues est utilisée pour la nutrition animale et principalement en aquaculture (**Rosenberg et al., 2008**). L'alimentation animale est la 2^{ème} application industrielle des microalgues sous forme de la biomasse microalgale (**Voort et al., 2015**).

I.6.2. Bioénergie

Les microalgues ont été proposées pour la première fois comme source d'énergie en 1941 par Harder et von Witsch. Les travaux sur la culture à grande échelle et les exigences techniques pour les systèmes de production des microalgues ont commencé à l'Institut de recherche de Stanford, Etats-Unis dans les années de 1948-1950, à Essen. Des études à l'échelle pilote ont également été menées par Imperial Chemical Industries Ltd en Angleterre par Geoghegan et en Israël par Evenari en 1953. Les premières études pilotes importantes sur la production de *Chlorella* ont été réalisées en 1951 par Arthur D. Little Inc. à Cambridge, Massachusetts, Etats-Unis.

A partir des années 1980 les Australiens ont commencé à s'intéresser à l'étude de *Botryococcus braunii*, qui produit des hydrocarbures extracellulaires à chaîne longue. Des études approfondies en Australie et en Europe par la suite, sur ces hydrocarbures extracellulaires ont été exploités par simple extraction non destructive. L'inconvénient reste le taux de croissance très faible de cette espèce, ainsi que la difficulté de la culture de cette espèce.

Pour produire du biodiesel, le taux de lipides est le critère le plus important mais n'est pas le seul. Certaines microalgues produisent plus de 80% de lipides mais croissent à une vitesse très lente (**Tasic et al., 2016; Ashokkumar et al., 2014**). Le cas le plus connu est *Botryococcus braunii*.

L'utilisation des microalgues pour la production des carburants n'est pas directement en concurrence avec la production alimentaire, comme le cas pour d'autres matières premières végétales. La vitesse de croissance des microalgues est 20 à 30 fois plus élevée que les plantes terrestres. En plus, les microalgues marines ne consomment pas d'eau potable durant leur cycle de croissance. Toutes ces vertus font des microalgues de véritables alternatives énergétiques.

A côté du biodiesel, de nombreux types de procédés de production de bioénergie ont été mises en place, telle que la production du bioéthanol (**Rizza et al., 2017; Bibi et al., 2017**), et le biohydrogène (**Bourke et al., 2017**).

Le bioéthanol devient une alternative intéressante comme substituant à l'essence d'origine fossile. Le bioéthanol à partir des microalgues est devenu une piste de recherche très importante. Les espèces de microalgues *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Chlorococcum* et *Tetraselmis* de la division *Clorophyta* et *Synechococcus* parmi d'autres cyanobactéries telles que *Spirulina sp*, *Chlorococcus*, *Gloeocapsa*, *Synechocystis* ont été largement étudiés comme matière première pour la production de bioéthanol (**de Farias Silva & Bertucco2016**). Plusieurs souches ont montré, dans certaines conditions, une accumulation de très hauts niveaux de glucides telles que *Scenedesmus obliquus* (**Ho et al., 2013**), *Porphyridium cruentum* (**Ho et al., 2017**), *Synechococcus sp.* ont accumulé environ 60% dans les conditions de manque d'azote dans le milieu de culture (**Mollers et al., 2014**). *Tetraselmis subcordiformis* a accumulé environ 45% de glucides dans le cas de carence en phosphore (**Yao et al., 2013**). *Chlorella vulgaris* dans des conditions d'appauvrissement en azote présente une augmentation de la teneur en glucides de 15-20% à 49-54%.

L'hydrogène commence à passer d'un combustible du futur à un porteur d'énergie du présent, promettant une pollution considérablement réduite et une efficacité accrue en carburant. Les microalgues sont une source prometteuse et probablement un moyen très efficace de produire du bio-hydrogène (**Chisti, 2007, Phanduang et al., 2017**). Ces microorganismes peuvent capturer l'énergie solaire et la transformer en énergie chimique, en convertissant l'eau en hydrogène moléculaire. Plusieurs études ont montré l'importance des microalgues comme source de production du bio-hydrogène (**Chemonva et al., 2017; Phanduang et al., 2017; Sevda et al., 2017**).

I.6.3. Application des microalgues pour la protection de l'environnement

Pour des raisons règlementaires, économiques et environnementales, les entreprises sont de plus en plus concernées par la diminution de l'empreinte environnementale de leurs activités. Cette tendance a entraîné l'avancement de nombreuses recherches dans le domaine du traitement des effluents industriels et plus particulièrement des eaux de procédés et les émissions de CO₂ industriels. Les microalgues sont apparues comme une solution dans une optique de durabilité environnementale. En effet, elles pourraient permettre de retirer efficacement les éléments chimiques en fortes concentrations dans les eaux usées, tels que les différentes formes de l'azote, le potassium, le phosphate, les métaux lourds et les autres éléments chimiques (**Cheng et al., 2016; Cheah et al., 2016, Schmidt et al., 2016**). Elles pourront aussi assimiler et tolérer les concentrations élevées de CO₂ et les autres gaz des émissions industrielles (**Kumar**

et al., 2016; Kargupta *et al.*, 2015; Bhakta *et al.*, 2015), avec comme second avantage la production de biomasse pouvant être utilisée comme matière première à la production de biocarburants.

Les chercheurs américains Oswald et Golueke ont proposé en 1960 l'utilisation des microalgues dans le traitement des eaux usées, via la conversion de la biomasse en biogaz (méthane) par le processus de fermentation. Repris depuis dans différents programmes, le principe a permis la restauration biologique et la valorisation de biomasse de plusieurs lacs ayant subi une eutrophisation. C'est le cas du Lac de Salton Sea en Californie, ce dernier souffre des rejets des différentes industries chimiques, avec un relargage de milliers de tonnes d'azote, de potassium ou encore de phosphate. Pour combattre ce phénomène les chercheurs ont cultivé des microalgues capables d'utiliser les nutriments inorganiques déversés par les industries au niveau des différents affluents du lac, dans le but d'assainir les populations de microalgues autochtones du lac (Oswald *et al.*, 1960).

I.6.4. Application des microalgues dans le domaine cosmétique et pharmaceutique

La biodiversité des microalgues constitue une source prometteuse pour le criblage des molécules bioactives d'intérêt cosmétique et pharmaceutique (Balduyck *et al.*, 2016; Ryu *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015). Les molécules extraites des microalgues utilisées pour l'application cosmétique, nutraceutique et pharmaceutique sont majoritairement, les acides gras polyinsaturés fonctionnels, les carotènes et les xanthophylles, les protéines et acides aminés, polysaccharides, enzymes, polyphénols, phytostérols et carbohydrates à haute valeur ajoutée comme les glucanes.

Ces dernières années ont vu naître une spécialité à la frontière de la pharmaceutique et du cosmétique qui intègre dans la fabrication des produits destinés aux soins de la peau, des agents actifs aux propriétés préventives et thérapeutiques semblables à celles des médicaments. Fait intéressant, est qu'un nombre croissant de fournisseurs de l'industrie cosmétique ont tendance à introduire des extraits à base de plantes, de macroalgues et de microalgues comme ingrédients dans des formulations de produits cosméceutiques. Ces extraits contiennent des vitamines et des minéraux et des actifs anti-âges et pour la protection contre les rayons ultraviolets, des effets antioxydants.

Pour l'application pharmaceutique, les produits issus de microalgues sont pour la plupart des molécules à haute valeur ajoutée, allant des métabolites lipidiques (acides gras polyinsaturés, EPA, DHA), pigments et caroténoïdes (β -Carotène, Lutéine, Fucoxanthine, Cataxanthine, Astaxanthine), stérols, protéines, polysaccharides ou oligosaccharides (β -glucan, ...), et autres. Sans oublier les protéines recombinantes obtenues par voie biotechnologiques en utilisant des souches de microalgues génétiquement modifiées comme usine cellulaire. Certains produits issus de microalgues constituent un marché mature d'autres sont en cours de développement ou en stade de recherche tels que les anti-cancéreux, les antiviraux, les antimicrobiens.

I.6.5. Application des microalgues dans l'agriculture

Depuis l'antiquité les algues ont été utilisées comme compost traditionnel dans le sol des champs cultivés. Ce traitement a montré plusieurs activités telles que l'amélioration de la croissance et la productivité des plantes, ainsi que l'amélioration de la structure du sol, de la rétention de l'eau ou de la disponibilité des nutriments (**Verkleij, F. N., 1992**). Ces procédés d'utilisation directe des algues sur le champ ont été aléatoires et non contrôlés. La recherche d'un procédé de valorisation de ces algues tout en conservant leurs propriétés biochimiques devient prioritaires. Plusieurs techniques pour l'application des algues dans l'agriculture voient alors le jour. Les premières techniques de valorisation des algues sont dérivées du brevet d'Hervé & Roullier en 1977 (US4023734) se basant sur un broyage à basse température et de Milton en 1952 portant sur l'extraction en milieu basique. Après cette initiation, plusieurs techniques et procédés sont développés pour l'application des algues dans l'agriculture.

Dans les dernières années, plusieurs études ont montré que des substances et extraits de microalgues stimulent la germination, la floraison, et la croissance des plantes (**Ismail et al., 2011, Faheed et Abd-El Fattah., 2008, Aly et al., 2008**). La tendance future semble être l'utilisation de l'activité biologique des produits de microalgues comme produits phytosanitaires (**Pulz and Gross, 2004**). Ainsi, le potentiel des microalgues comme source d'une nouvelle classe de substances biologiques phytoprotectrices est à considérer comme important (**Pulz and Gross, 2004**). **Garcia-consalez 2016**, a montré un effet de fertilisation et de stimulation de l'extrait *Acutodesmus dimorphus* testé sur les graines de tomate. Une autre étude a montré que la microalgue *Chlorella vulgaris* a un effet de fertilisation du Maïs (**Uysal et al., 2015**). L'étude de **Fahed et al., 2008** a montré que le traitement des graines de la laitue par un extrait de *Chlorella vulgaris* a permis la stimulation de la croissance. D'autres études ont montré que les

microalgues ont un pouvoir d'élucider la défense des plantes contre les stress biotiques (**Sbaihat et al., 2015; Stokajowska et al., 2008**) et abiotiques (**Kirst 1989; Talebi et al., 2013**).

I.7. Molécules d'intérêts produites par les microalgues.

L'intérêt majeur de la culture de microalgues est la production de molécules à hautes valeurs ajoutées. Les microalgues sont une source importante de lipides, de protéines, de polysaccharides et de pigments.

I.7.1. Les microalgues comme sources de lipides d'intérêt industriel

Les lipides sont des produits majoritaires et essentiels pour la cellule microalgue. Les microalgues sont constituées globalement de 16 à 80% de lipides en fonction des espèces (**Harun et al., 2010**), ces lipides sont divisés en deux catégories, les lipides de réserves et les lipides membranaires. Ces microorganismes stockent les lipides sous forme des triglycérides avec une très grande variété des acides gras, dont la composition varie selon les espèces.

Les microalgues produisent des acides gras spécifiques qui peuvent trouver différentes utilisations (agroalimentaire, pharmaceutique, biocarburant,...). La diversité biochimiques des lipides des microalgues peuvent être valorisée dans plusieurs applications telle que les lipides neutres qui sont propices à la production des biocarburants (**Abomohra et al., 2017; Piloto-Rodríguez et al., 2017**), les OMEGA 3 qui peuvent être extraits et utilisés comme complément alimentaire (**Kaewsutas et al., 2017**). Les microalgues synthétisent également des acides arachidonique et eicosapentaénoïque (EPA) et linoléique. L'EPA et l'acide arachidonique peuvent moduler le métabolisme humain. L'acide arachidonique est un composant des membranes phospholipidiques et est précurseur des prostaglandines, alors que l'EPA est précurseur des eicosanoïdes (**Rebeloso Fuentes et al., 2000**). L'environnement et les conditions de cultures impactent la composition et la teneur en lipides des microalgues (**Chokshi et al., 2017 ; Danish et al., 2017**).

I.7.2. Les microalgues comme source de protéines d'intérêt

Les microalgues sont très riches en protéines concurrentes, en quantité et en qualité, avec d'autres sources de protéines alimentaires telles que le soja, les œufs et le poisson. La spiruline par exemple contient entre 50 et 70% de protéines selon les souches (**Plaza et al., 2009**). Plusieurs autres microalgues ont montré un potentiel élevé de production des protéines telles que *Dunaliella sp* (**Tavallaie et al., 2015**), *Chlorella sp* (**Salati et al., 2017**). Les microalgues

synthétisent les 20 acides aminés protéinogènes et peuvent être des sources non conventionnelles d'acides aminés essentiels pour la nutrition humaine (Spolaore et al., 2006). L'utilisation de peptides bioactifs dérivés des protéines des microalgues comme ingrédients fonctionnels dans les aliments est une voie d'innovation alimentaire qui se développe rapidement. Les peptides bioactifs sont des résidus d'acides aminés protéinogènes à chaîne courte joints par des liaisons peptidiques et sont produits par clivage enzymatique de protéines lors de la digestion des aliments, de la fermentation microbienne, de la transformation des aliments ou de l'hydrolyse enzymatique exogène (Ejik et al., 2016). D'autres microalgues sont connues comme espèces riches en protéines, telles que *Synechococcus sp.* (Environ 63%), *S. maxima* (60 à 71%) et *Chlorella vulgaris* (51 à 53%) (Coustets et al., 2016)

I.7.3. Les microalgues comme source de des pigments d'intérêt

Vu la diversité et la complexité des écosystèmes aquatiques, les microalgues ont le potentiel d'être une source très importante pour la production des molécules à haute valeur ajoutée. L'une des caractéristiques les plus marquantes des algues est leur couleur, qui est déterminée par leurs pigments. Ces pigments sont des substances chimiques colorées qui font partie du système photosynthétique des microalgues. Elles se distinguent en trois catégories : les caroténoïdes (0,1 à 0,2% du poids sec en moyenne et jusqu'à 14% du poids sec de la b-carotène chez certaines espèces), les chlorophylles (0,5 à 1,0% du poids sec) et Phycobiliprotéines (jusqu'à 8% du poids sec) (Christaki et al., 2015). Les espèces les plus utilisées industriellement pour leur contenu en pigments sont : *Dunaliella salina* pour la production des caroténoïdes est surtout les bêta-carotènes (Hosseini et al., 2017, Saha et al., 2013), *Haematococcus pluvialis* pour la production de l'asthaxantine (Zheng et al., 2017), *Chlorella spp.*, *Muriellopsis spp.*, *Scenedesmus spp.* pour la production des chlorophylles, *Spirulina (Arthrospira) spp.* pour la production de la phycocyanine, and *Porphyridium spp.* pour la production (Ibáñez-González et al., 2016; Tang et al., 2016).

I.7.4. Les microalgues comme source de polysaccharides d'intérêt

Les polysaccharides sont des molécules d'hydrates de carbone comprenant de longues chaînes de monosaccharides liés par des liaisons glycosidiques qui, par hydrolyse, donnent leurs monosaccharides et oligosaccharides constitutifs. Les polysaccharides sont largement présents dans diverses ressources, telles que les végétaux, les bactéries, les champignons, les algues et ou les animaux. Ils ont un grand nombre de groupes fonctionnels bioactifs, une composition

chimique variable et des poids moléculaires de grande diversité, qui définissent leurs propriétés (Devi et al., 2016). Dans les dernières années, les polysaccharides ont été utilisés comme ingrédients alimentaires et cosmétiques et dans les applications nutraceutiques et pharmacologiques, de sorte que les polysaccharides sont actuellement produits à partir de nombreuses sources, en soutenant des industries économiquement importantes au niveau mondial. Les polysaccharides peuvent être produits à partir de nombreuses sources telles que les algues, les plantes, les champignons et les microalgues. Les microalgues sont devenues une source très importante des polysaccharides biologiquement actifs et pourront être valorisés dans différentes applications (Chaiklahan et al., 2013). Plusieurs souches de microalgues ont été utilisées comme source pour la production des polysaccharides avec une bonne quantité et qualité telles que *Chlorella*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Porphyridium*, *Isochrysis*, *Dunaliella*, *Spirulina*. Les polysaccharides des microalgues ont montré plusieurs activités très importantes telles que l'activité antioxydante (Chaiklahan et al., 2013), activité anti-cancéreuse (Kurd et al., 2015), antidiabétique (Nuno et al., 2015). Dans le domaine de l'agriculture, les polysaccharides ont montré un effet de stimulation de la germination (EL Arroussi et al., 2015), la croissance (Khan et al., 2009) et la défense naturelle des plantes (EL-Modafar et al., 2012). Ils ont également un pouvoir antioxydant contre les radicaux libérés dans les conditions des stress environnementaux via l'induction des voies de biosynthèse des enzymes antioxydants dans les plantes (Raposo et al., 2016).

II. Biostimulants des plantes

Les biostimulants des plantes, ou biostimulants agricoles, comprennent diverses substances et/ou microorganismes qui agissent sur les plantes. Le marché mondial des biostimulants devrait atteindre 2 241 millions de dollars en 2018 avec un taux de croissance annuel de 12,5% entre 2013 et 2018 (Anonymous, 2013). Dans le marché de l'agriculture on trouve plusieurs produits destinés à l'agriculture sous plusieurs nominations telles que les phytostimulants, les bioactivateurs, les biostimulants qui sont vendus pour l'amélioration de la germination, la croissance, la qualité et le rendement des cultures.

II.1. Historique et Définition des biostimulants

La première apparition du mot biostimulant des plantes a été publiée en 1997 dans le site web du ministère des cultures et sciences environnementales du sol par Zhang et Schmidt de l'institut polytechnique de Virginia:

« Un biostimulant est une substance en quantité infime qui améliore la croissance des plantes », cette définition a apporté la notion de quantités infimes pour distinguer les biostimulants des fertilisants.

A cette date, seule les acides humiques et les extraits d'algues ont été mentionnées comme source de biostimulants.

En 2003, Fardeau & Jonis; ont défini les biostimulants comme substances, qui dans certaines conditions, vont favoriser la nutrition ou la croissance ou le développement et dont la finalité consiste à accroître qualitativement ou quantitativement les récoltes (**Fardeau & Jonis, 2003**). Les éliciteurs étant un sous-groupe de phytoestimulants car ils agissent sur un mécanisme précis : la stimulation des mécanismes de défense (**Fardeau & Jonis, 2003**).

Un produit peut avoir simultanément les fonctions d'éliciteur et de phytoestimulant (**Pioggesi & Pollison, 2003**).

Kauffman a écrit en 2007 que les biostimulants sont des substances, autres que les fertilisants, appliqués en petite quantité pour promouvoir la croissance des plantes », dans cette définition l'auteur a ajouté le mot 'autres que les fertilisants' par rapport aux définitions précédentes, et il a cité comme source des biostimulants, les produits contenant les hormones, et les produits contenant les acides aminés (**Kauffman, 2007**). En 2014, le conseil européen de l'industrie des biostimulant (European Biostimulant Industry Council : EBIC) a défini le biostimulant comme « Un matériel qui contient une (des) substance(s) et/ou microorganisme(s) dont la fonction, quand appliqués aux plantes ou à la rhizosphère, est de stimuler les processus naturels pour améliorer l'absorption des nutriments, l'efficacité des nutriments, la tolérance aux stress abiotiques, et la qualité des cultures, indépendamment du contenu en nutriments du biostimulant. » (**EBIC, 2014**).

Cette définition a été remaniée à plusieurs reprises pour en arriver à la définition actuellement proposée par l'EBIC dans ses différents rapports et conférences (**EBIC, 2014**). Cette définition est encore en cours de validation entre différents groupes de travail, notamment au niveau de la notion de « qualité des cultures » puisque cet aspect est encore débattu. On peut noter cependant que depuis la première définition proposée par Patrick du Jardin, la réponse aux stress a été précisée. En effet, dans le rapport de 2012 (**Du Jardin, 2012**), des stress biotiques et abiotiques étaient considérés. A l'heure actuelle, la définition acceptée par les membres d'EBIC ne concerne que les stress abiotiques (**EBIC, 2014**).

La dernière Définition des biostimulants a été publiée par Patrick du Jardin en 2015):

«Un Biostimulant est une substance ou microorganisme appliqué aux plantes dont le but est de renforcer l’efficacité de la nutrition, la tolérance aux stress abiotique et/ou les caractéristiques de la qualité des fruits, indépendamment de leur contenu en nutriments nutritifs». Cette définition pourrait être complétée par : « En extension, biostimulants sont tous les produits commerciaux contenant des mélanges de ces substances et / ou des micro-organismes.» (Patrick du Jardin, 2015).

Les effets associés à cette définition sont :

- Améliorer l’efficacité du métabolisme des plantes dans le but d’améliorer la qualité ou le rendement
- Augmenter la tolérance aux stress abiotiques
- Faciliter l’assimilation des éléments nutritifs
- Augmenter la qualité des récoltes
- Améliorer certaines propriétés physico-chimiques du sol.

La terminologie associée aux produits de stimulation est variée et complexe du fait du foisonnement de définitions et d’une absence d’harmonisation (Figure 4).

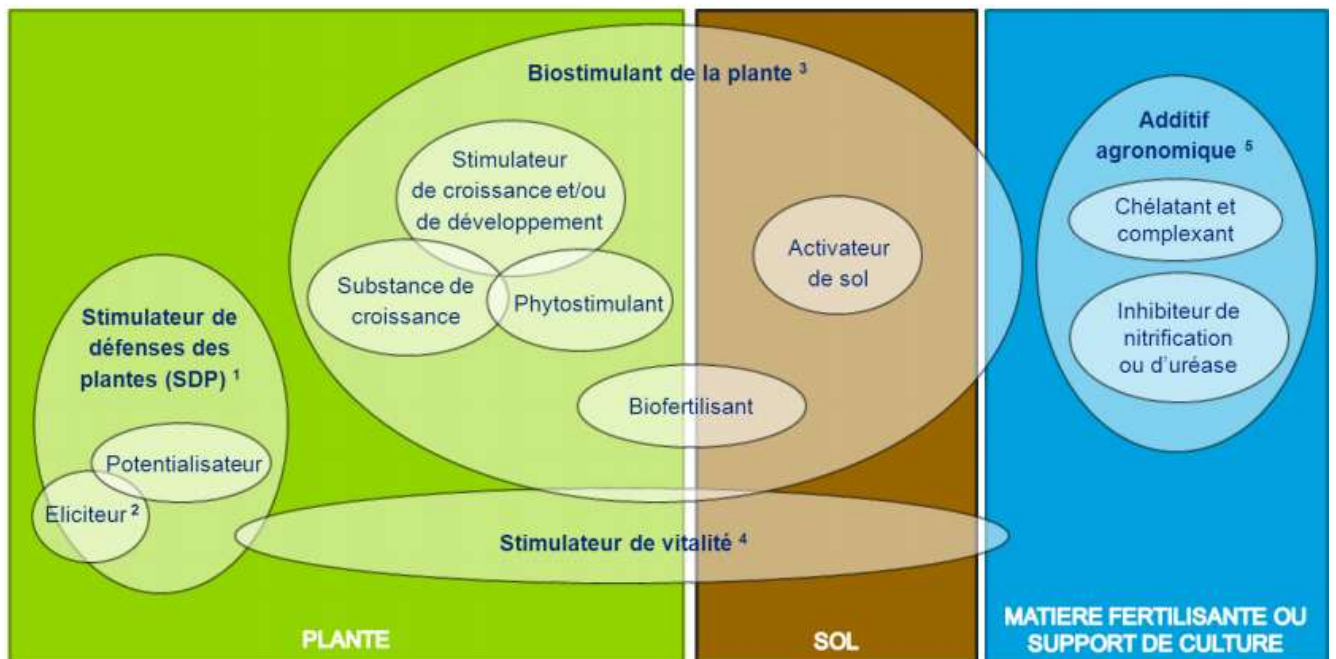


Figure 4: Cartographie des cibles des principales terminologies identifiées pour les produits de stimulation des plantes.

Définitions utilisées (termes utilisés) selon : (Fardeau & Jonis, 2003); 2: (Kauffman, 2007); 3: (EBIC, 2014); 4: (Patrick du Jardin, 2015)

II.2. Catégories des biostimulants des plantes

Malgré les projets récents visant à trouver un statut réglementaire de biostimulants, jusqu'à maintenant il n'y a pas de texte légal ou réglementaire de ces produits au niveau mondial, y compris le Maroc. Sinon quelques textes de projet de loi réglementaire sont en phase d'élaboration au niveau européen par EBIC. Pour les catégories des biostimulants jusqu'à maintenant il y a qu'une petite liste considérée comme biostimulants inclue quelques substances et microorganismes. Certaines grandes catégories de substances et microorganismes sont largement reconnues par les scientifiques, les organismes de réglementation et les industriels (Calvo et al., 2014 ; Halpern et al., 2015). Ces catégories sont : les substances humiques, hydrolysats des protéines, extraits d'algues et de plantes, polysaccharides, composés inorganiques, et les microorganismes bénéfiques.

II.2.1. Microorganismes bénéfiques associés aux plantes

Les microorganismes du sol associés des plantes sont connus depuis longtemps pour leurs potentiels de stimulation des plantes, ainsi la régulation de la relation plante-sol. Ces microorganismes ont un effet de stimulation des mécanismes de stimulation de la croissance (Rahmoune et al., 2017; Grobelak et al., 2015), l'assimilation des nutriments (Ahmad et al., 2017). Les PGPR participent aussi par des modifications globales du fonctionnement des plantes à l'amélioration de la santé des plantes. Plus particulièrement, certaines PGPR induisent une amélioration des résistances des plantes à des stress abiotiques et biotiques. Ils provoquent la stimulation de la tolérance des plantes aux stress abiotiques comme le stress salin (Bamawal et al., 2017, Han et al., 2017). La bactérie *Azospirillum lipoferum* induit une augmentation de la concentration en ABA et conduit à un meilleur statut hydrique du maïs lors d'un stress hydrique (Cohen et al., 2009). Certaines bactéries sont donc capables de modifier les capacités photosynthétiques (Rincon et al., 2008) mais aussi de moduler la teneur en chlorophylle lors d'un stress hydrique (Heidari & Golpayegani, 2012; Stefan et al., 2013). L'inoculation des plantes par trois bactéries, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, et *Serratia sp* a induit un meilleur maintien de la teneur en chlorophylle lors d'un stress hydrique et par conséquent les plantes ont des feuilles plus vertes et présentent moins de symptômes liés au stress (Wang et al., 2012). Ainsi que ces microorganismes permettent la stimulation de la défense naturelle des plantes contre les pathogènes (Adam et al., 2017, Gupta et al., 2017).

II.2.2. Substances humiques

Les substances humiques (SH) sont formées par des transformations chimiques et biologiques de la matière végétale et animale et du métabolisme microbien, et représentent le principal réservoir de carbone organique à la surface de la terre (Canellas *et al.*, 2015). On retrouve fréquemment ces substances dans les sols, les eaux de surface, les eaux usées, le compost, les sédiments marins et ceux des lacs, les tourbières, les schistes carbonneux et les lignites. Les substances humiques sont des molécules de faible poids moléculaire formant des associations dynamiques stabilisées par des interactions hydrophobes et des interactions hydrogènes (Conte & Piccolo, 1999 ; Smejkalova & Piccolo, 2008). Il existe trois types de substances humiques dont l'acidité et la composition chimique diffèrent légèrement ; il s'agit des acides humiques, des acides fulviques et des humines. Elles contribuent à la régulation de nombreux processus écologiques et environnementaux cruciaux. Elles stimulent la croissance des plantes et la vie terrestre en général, et interviennent dans la régulation du cycle de carbone du sol et le cycle de l'azote, le devenir et le transport des composés anthropiques et des métaux lourds et la stabilisation de la structure du sol. Les substances humiques peuvent favoriser la croissance des plantes par l'induction du métabolisme du carbone et de l'azote (Canellas *et al.*, 2015). La Nitrate réductase (NR), la glutamate déshydrogénase (GDH) et la glutamine synthétase (GS) sont des enzymes liées aux voies d'assimilation de l'azote et ont été stimulées par les substances humiques, et par conséquent la stimulation de la croissance et la productivité des cultures (Hernandez *et al.*, 2015). Outre les changements significatifs du métabolisme primaire des plantes et l'absorption des nutriments, elles peuvent aussi fortement influencer le métabolisme secondaire (Schiavon *et al.*, 2010). Ces substances ont un effet de stimulation des métabolismes liés à la défense et la résistance des plantes aux stress abiotique et biotique, par exemple, les substances humiques ont stimulé l'expression de la phénylalanine (tyrosine) ammonialyase (PAL/TAL) qui catalyse la première étape principale de la biosynthèse des composés phénoliques. L'expression de PAL/TAL s'accompagne d'une accumulation de phénol dans les feuilles (Olivares *et al.*, 2015; Azevedo and Lea, 2011). L'acide humique a stimulé la germination, la croissance et l'assimilation des nutriments de la tomate dans les conditions de stress salin (Dursun *et al.*, 2004).

II.2.3. Hydrolysat des protéines

Les hydrolysats de protéines sont une catégorie de biostimulants des plantes constituée d'un mélange de polypeptides, oligopeptides et acides aminés qui sont fabriqués à partir de sources

de protéines utilisant une hydrolyse partielle des résidus de l'agro-industrie tels que les résidus végétaux et animaux» (Colla *et al.*, 2014 ; Halpern *et al.*, 2015 ; Schaafsma *et al.*, 2009; Schiavon *et al.*, 2008). D'autres molécules de synthèse sont connues comme composés contenant-N tels que les bétaines, acides aminés et les polyamines sont cités comme biostimulants des plantes (Colla *et al.*, 2014 ; Vranova *et al.*, 2011). Les effets de l'hydrolysats des protéines et les composés azotés sur les différentes voies métabolique des plantes sont largement décrits dans la littérature tels que la stimulation de la croissance (Colla *et al.*, 2014 ; Ertani *et al.*, 2013), stimulation de l'assimilation des nutriments (Ertani *et al.*, 2009 ; Schiavon *et al.*, 2008), amélioration de la structure du sol et stimulation de la microflore du sol (García-Martínez *et al.*, 2010).

II.2.4. Extraits d'algues

Les macroalgues comprennent près de 10 000 espèces et contribuent à environ 10% de la productivité marine mondiale totale (Battacharyya *et al.*, 2015). Les algues sont des éléments essentiels des écosystèmes marins côtiers, car elles fournissent un abri et de la nourriture à de nombreux biotes marins et peuvent même contribuer à la modification des propriétés physico-chimiques de l'eau de mer. Une proportion relativement faible du nombre total d'espèces d'algues marines revêt une importance significative en tant qu'aliments et suppléments animaux et humains ainsi que dans l'agriculture en tant que source de biostimulant des plantes. En général, les extraits d'algues, même à de faibles concentrations, sont capables d'induire un ensemble de réponses physiologiques et biochimiques dans la plante, telles que la promotion de la croissance des plantes, l'amélioration de la floraison, ainsi l'amélioration de la qualité des produits (Rengasamy *et al.*, 2016). En outre, il a été décrit que des applications de différents types d'extrait augmentent la tolérance des plantes à une large gamme de contraintes abiotiques telle que la salinité (Manaf *et al.*, 2016), et la sécheresse (Xu *et al.*, 2015).

Ces effets biostimulants ont d'abord été attribués à la présence, dans les extraits d'algues, d'hormones ou d'analogues d'hormones de croissance. Mais plus récemment, il a été suggéré que de grosses molécules de polysaccharides et de polyphénols pourraient également jouer un rôle dans la résistance aux stress. Comme les autres biostimulants, les extraits d'algues, qui ne sont pas nécessairement appliqués au sol mais peuvent être pulvérisés sur les feuilles, favorisant le développement et la ramification du système racinaire et améliorent l'acquisition des nutriments. Il faut noter que la stimulation de la croissance des racines pourrait résulter d'un

effet indirect lié à une augmentation de la diversité au sein des communautés microbiennes de la rhizosphère.

Les extraits d'algues ont une multitude d'effets sur le métabolisme des plantes, et l'analyse de l'expression des gènes montre que de nombreuses fonctions sont affectées par l'apport d'extraits d'algues. Ces effets sur le métabolisme de la plante sont également responsables de l'amélioration de la résistance aux stress, dont les mécanismes sont encore loin d'être élucidés.

II.2.5. Les polysaccharides

Les polysaccharides ainsi que les oligosaccharides, le groupe le plus abondant de biopolymères, participent à de nombreux processus biologiques tels que la communication cellule-cellule, le développement embryonnaire, l'infection de bactéries et/ou de virus et l'immunité cellulaire. Dans les dernières années, les polysaccharides ont été considérés comme molécules d'intérêt industriel en raison de leurs importantes activités biologiques. Ces macromolécules sont utilisées dans les différentes applications telles que l'activité antioxydante (**Fan et al., 2017; Guo et al., 2010 ; Li et al., 2017 ; Sun et al., 2014; Xu et al., 2011**), l'activité immunostimulante (**Qi et al., 2017; Yu et al., 2017**), activité anti-tumorale et antibactérienne (**Wu et al., 2016; Ye et al., 2008**), antivirale (**Chen et al., 2016; Xie et al., 2016; Hasui et al., 1995**). Dans le domaine de l'agriculture, les polysaccharides sont considérés parmi les catégories des biostimulants des plantes pour plusieurs revendications. Dans les dernières années les polysaccharides sont devenus une source très importante pour la stimulation de la croissance (**Gonzalez et al., 2011; Vera et al., 2011, Kosenko et al., 2000, Shukla et al., 2016**) et la protection des plantes contre les stress biotique et abiotique (**Simic et al., 2015; Bi et al., 2011; Milling et al., 2011; Shibuai et al., 2001**). L'amélioration de la qualité nutritionnelle des cultures (**Xu et al., 2017**). Les activités biologiques des polysaccharides sont fortement affectées par leur structure chimique et leurs conformations. Les polysaccharides des microorganismes (champignons, levures et bactéries), les algues, les plantes et les animaux sont toujours physiquement et/ou chimiquement couplés avec d'autres biomolécules, telles que des protéines, des polynucléotides, des lipides, de la lignine et certaines substances groupement minérales inorganiques (**Liu et al., 2015**). Par conséquent, la compréhension globale des rôles importants des polysaccharides bioactifs dans les sciences de la vie et l'exploration de leur application nécessitent la collaboration multidisciplinaire d'experts sur les polysaccharides végétaux et microbiens, la glycochimie, la glycobiologie, la glycomédecine, la phytologie et la zoologie. Plusieurs souches de microalgues sont cultivées pour leurs potentiels de production des

polysaccharides biologiquement actifs tels que *Rhodella sp*(Villay et al., 2013), *Porphyridium marinum* (Soanen et al., 2016), *Dunaliella sp* (Mishra et al., 2011; Goo et al., 2013), *Spirulina sp* (Chaiklahan et al., 2013; Kurd et al., 2015). Vu leur importance, les polysaccharides algaux ont reçus une attention considérable en tant que biomatériaux fonctionnels pour des applications nouvelles et à forte valeur ajoutée en raison de leurs propriétés non toxiques, biocompatibles et biodégradables. L'isolement approprié des polysaccharides bioactifs et la détermination de leurs caractéristiques structurales permettent une compréhension claire du mécanisme de l'action biologique et des relations structure-activité.

II.3. Modes d'action des biostimulants

Les produits biostimulants ont une action soit sur la plante soit sur le sol. Généralement les biostimulants sont des produits complexes contenant une multitude de substances actives. L'effet observé est le résultat de plusieurs actions provoqués par un ensemble de substances actives qu'il est difficile de décrire séparément. Néanmoins, il est possible de présenter le mode d'action global de chacun des principales catégories de biostimulants.

II.3.1. Microorganismes

Les bactéries et les champignons utilisés en tant que biostimulants sont appliqués sur les semences, les feuilles ou le sol. L'effet souvent observé est la capacité d'améliorer la nutrition des plantes. Par conséquent, ces micro-organismes sont utilisés comme activateur de la fertilisation « classique », pour l'amélioration de l'efficacité d'utilisation des nutriments (Calvo et al., 2014).

L'inoculation de plantes cultivées avec l'inoculant microbiens pourrait entraîner l'expansion et l'allongement du système racinaire, conduisant à une absorption améliorée de l'eau et des nutriments (Halpern et al., 2015). Par ailleurs, certaines bactéries sécrètent des substances stimulant directement la croissance des plantes, comme des phytohormones (auxines, gibbérellines, cytokinines, éthylène) ou des molécules volatiles (2,3-butanediol, acétoïne, etc.)(Kumar et al., 2007). Les voies de signalisation ainsi stimulées par ces molécules exogènes conduisent à une stimulation de la croissance (racinaire ou végétative), à une augmentation de la teneur en chlorophylle, voire à une meilleure résistance aux stress abiotiques (Alori et al., 2017).

Les microorganismes ont une influence sur les mécanismes de La fixation de l'azote atmosphérique, la solubilisation de minéraux tels que le phosphore (P) (**Babalola 2010**). Pour la protection des plantes, les inocula microbiens affectent le statut des plantes en provoquant la résistance systémique induite (ISR) ou la résistance acquise systémique (SAR), en améliorant la résistance aux maladies. Ces actes empêchent les pathogènes transmis par le sol d'inhiber la croissance des plantes (**Yang et al., 2009**). La capacité de déclencher une voie indépendante de l'acide salicylique (SA) pour contrôler la résistance systémique est un trait commun des bactéries de bio-contrôle induisant l'ISR. Des déformations structurelles dans des champignons pathogènes dans des conditions de culture in vitro par la production de composés antifongiques diffusibles et volatils ont été rapportées. La souche bactérienne a réussi à restreindre la croissance de tous les champignons d'essai dans des cultures mixtes et induit des anomalies morphologiques telles que des déviations mycéliennes et conidiales. Il convient également de noter la production de sidérophores qui solubilisent et séquestrent le fer (**Hmaeid et al., 2014**).

II.3.2. Substance Humiques

Les substances humiques sont des molécules complexes difficiles à caractériser et à comparer. Le mode d'action des substances humiques est complexe et est encore peu connu. Une partie de ces molécules peut être assimilée par les plantes et ainsi agir directement sur les voies métaboliques (**Nardi et al., 2002**). Les acide fulvique et l'acide humique semblent tout de même agir différemment sur la plante (**Calvo et al., 2014; Trevisan et al., 2010**). Les substances humiques dans les sols sont structurées dans un agencement supra structural de petites unités bioactives stabilisées par des forces relativement faibles à un pH faible ou neutre (**Canellas et al., 2015**). Les acides organiques exsudés par les racines des plantes peuvent dissociés cette structure humique complexe et permettre aux sous-unités biologiquement actives d'accéder aux cellules, déclenchant ainsi une série de processus physiologiques dans les plantes qui améliorent le développement et la tolérance au stress abiotique (**Canellas et al., 2015; García et al., 2012**). Les substances humiques provoquent une réduction de la sensibilité des plantes aux stress environnementaux tels que le stress hydrique (**García et al., 2014**). Les substances humiques ont également un effet sur l'assimilation des nutriments. La manière dont les substances humiques favorisent l'assimilation des ions (Na^+ , Ba^{2+} , NO_3^- , SO_4^{2-} , K^+ , etc.) et stimulent les voies métaboliques de la croissance, le développement racinaire et la photosynthèse des plantes sont très variables. Les substances humiques assimilées par les plantes semblent agir sur l'expression des enzymes impliquées dans ces mécanismes (**Tavares et al., 2017**).

II.3.3. Extraits des algues

Les algues sont constituées d'une multitude de composés (hormones, acides aminés, microéléments bénéfiques non essentiels tels que le silicium ou le sélénium, sucres, etc.), ce qui implique un ensemble complexe de modes d'action pouvant expliquer les effets observés.

Les extraits d'algues peuvent déclencher des multitudes de réactions métaboliques touchant toutes les voies dans la plante telles que les voies de la tolérance des carences en azote en stimulant l'expression de la nitrate réductase grâce à certains composés comme le mannitol (**Durand et al., 2003 ; Phytoma, 2005**), ainsi que la stimulation de phosphatases racinaires par certaines molécules des algues (**Klarzynski et al., 2006**). Des molécules des algues comme les polysaccharides, les acides aminés peuvent réagir comme chélateurs des nutriments chimiques présents dans le sol (**Calvo et al., 2014**), dans le même sens les polysaccharides tels que les alginates et les fucanes ont un effet de l'amélioration de la structures du sol et donc l'amélioration de l'aération et le taux de l'humidité de ces sols permettant une meilleures installation des systèmes racinaires et donc une meilleure croissance des plantes (**Khan et al., 2009**).

Certaines molécules présentes dans les extraits d'algues (polysaccharides, polyamines) agissent sur la synthèse et l'activité des hormones endogènes (**Faessel et Morot-Gaudry, 2009**), et donc agissent directement sur la croissance et le développement de la plante. Des molécules comme la bêtaïne-glycine et la proline inhibent la dégradation des chlorophylles ce qui favorise la photosynthèse. Ces molécules stimulent ainsi les mécanismes antioxydants et jouent le rôle d'osmorégulateurs dans les conditions de stress salin (**Khan et al., 2009**).

II.3.4. Acides aminés et autres dérivés protéiques composant les biostimulants

Les hydrolysats des protéines d'origine végétale ou animale (contenant des peptides et acides aminés) et les acides aminés purifiés sont considérés comme deux catégories distinctes des biostimulants (**Calvo et al., 2014**).

Chaque catégorie de ces produits va avoir son propre mode d'action en fonction des acides aminés considérés et de leur concentration. Les hydrolysats protéiques favorisent la stimulation de la nitrate réductase et donc la nutrition azotée, et stimulent certains signaux moléculaires intervenant dans le développement racinaires des plantes et la synthèse de certaines métabolites

qui améliorent la qualité des fruits tels que l'anthocyanine et les caroténoïdes (**Nardi et al., 2016**). Quelques acides aminés comme la glycine et la proline sont des molécules qui agissent comme stimulatrices de la tolérance des plantes aux stress abiotiques tel que le stress salin (**Gharbi et al., 2017**), alors que la glycine et l'acide glutamique sont des acides aminés précurseurs de la synthèse de la chlorophylle (**Amirkhani et al., 2016**).

Le mode d'action des biostimulants à base de protéines est peu connu. Quelques études ont identifié les voies métaboliques cibles et certains des mécanismes de leur effet sur les plantes (**Schiavon et al., 2008; Ertani et al., 2011, Ertani et al., 2013**). En particulier, les données disponibles jusqu'à présent suggèrent que les hydrolysats de protéines permettent la régulation du métabolisme C et N, et par conséquent la stimulation de l'assimilation de l'azote chez les plantes. L'hydrolysats de protéine de la luzerne a montré une accumulation de sucre soluble et une stimulation de l'assimilation de l'azote des plantes de maïs (**Schiavon et al., 2008**). Cette étude a montré aussi que ce type de biostimulant a augmenté l'activité de trois enzymes (malate déshydrogénase, isocitrate déshydrogénase et citrate synthase) fonctionnant dans le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) et cinq enzymes (nitrate réductase, nitrite réductase, glutamine synthétase, glutamate synthase et aspartate aminotransférase) impliquées dans la réduction et l'assimilation de l'azote. La régulation positive induite par les biostimulants des gènes codant pour ces enzymes a été confirmée par des expériences de RT-PCR. Dans une autre étude, le même biostimulant a permis d'améliorer la croissance des plantes de maïs cultivées sous stress salin, en augmentant le rapport Na^+ et K^+ dans les feuilles et la synthèse des flavonoïdes (**Ertani et al., 2013**).

II.3.5. Polysaccharides

Dans les dernières années les polysaccharides ont connu une grande importance pour la stimulation des plantes. Plusieurs études ont montré que les polysaccharides ont différentes activités sur les plantes tels que l'activité antioxydante et l'activité de stimulation de la germination et la croissance (**Han et al., 2016**), l'activité antivirale (**Luiz et al., 2016**), la croissance et la protection des plantes (**Abreu et al., 2016 ; Moenne A, 2016 ; Ramirez-Estrada et al., 2016**). Les polysaccharides et les oligosaccharides extraits des algues ont un effet de stimulation de la croissance des plantes par la stimulation de l'assimilation des nutriments et la stimulation de la photosynthèse par l'amélioration de l'assimilation du carbone (**Gonzalez et al., 2013**).

Les modes d'action des polysaccharides sont peu connus et très divers. Les plantes terrestres vertes sont des organismes autotrophes, immobiles. Elles ont évolué diverses voies métaboliques complexes pour capter l'énergie et de synthétiser des métabolites nécessaires à leur croissance et leur développement (Yu et al., 2015). Les polysaccharides tels que les carraghénanes, les oligocarraghénanes stimulent la croissance des plantes terrestres vertes par modulation de divers processus physiologiques et biochimiques (Shukla et al., 2016). Ces polysaccharides sulfatés semblent agir comme des molécules de signal (Lemonnier-Le Penhuizic et al., 2001).

Les carraghénanes ont également montré leur effet de stimulation de la croissance en stimulant la photosynthèse et la fixation du carbone dans les plantes de tabac, par l'induction de la ribulose 1, 5 bisphosphate carboxylase / oxygénase (Rubisco) (Muñoz et al., 2011). De même, on constaté que la pulvérisation de ces polysaccharides sur les feuilles de tabac a augmenté la taille, le poids, la surface foliaire, et la teneur en chlorophylle de ces plantes. Ainsi ils ont stimulé la fixation du carbone et de l'assimilation de l'azote. La Rubisco et d'autres enzymes impliquées dans le métabolisme de base tels que le glutamate déshydrogénase, pyruvate déshydrogénase, l'isocitrate déshydrogénase, l'inosine monophosphate déshydrogénase et glucose-6-phosphate déshydrogénase présentaient une activité plus élevée. Les polysaccharides algaux ont permis l'activation des enzymes de la réduction de NADP(H), ce qui favorise la photosynthèse (Castro et al., 2012). NAD⁺ et NADP⁺ sont des composés réducteurs essentiels pour la croissance des plantes en tant que cofacteurs d'enzymes impliquées dans le transport d'électrons et les processus métaboliques (Hashida et al., 2009). Les polysaccharides algaux ont montré la stimulation de la biosynthèse des hormones de croissance végétale telles que l'acide indole-3-acétique (IAA), l'acide gibbérellique (GA3) et de trans-zéatine et la modification du statut redox des cellules végétales (González et al., 2014).

II.3.6. Autres substances classées comme biostimulants des plantes

Certaines phytohormones, vitamines et des éléments chimiques sont classées comme biostimulants des plantes. L'acide abscissique, par exemple, permet la stimulation des mécanismes physiologiques face aux stress abiotiques tels que la sécheresse, le froid et les stress osmotiques. Elle permet l'activation de la fermeture des stomates ce qui préserve l'eau à l'intérieur de la cellule (Finkelstein et al., 2002). Le tocophérol est une forme de la vitamine E qui a un effet antioxydant qui améliore la tolérance des plantes aux stress oxydatifs. Le silicium (Si) est un élément minéral non essentiel dont les bénéfices pour la croissance des plantes

(Guntzer *et al.*, 2011), stimulation de la tolérance des plantes à certains stress abiotiques, le contrôle et la régulation de l'absorption du phosphate (Guntzer *et al.*, 2011), aussi, la stimulation l'absorption de K, N et Ca (Guntzer *et al.*, 2011).

II.4. Les effets majeurs des produits à base d'algues utilisés comme biostimulants des plantes

Les algues sont considérées comme l'une des ressources durables les plus importantes à potentiel industriel. La biochimie des algues présente des caractéristiques très importantes (Thomas *et al.*, 2013, Michalak *et al.*, 2015). Les extraits d'algues contiennent des composants tels que les polysaccharides (galactan, fucoidan, alginate et laminarine), les protéines (par exemple les lectines), les acides gras polyinsaturés (PUFA), les pigments (chlorophylles, caroténoïdes et phycobiliprotéines), les polyphénols (les acides phénoliques, les flavonoïdes, l'acide cinnamique, les isoflavones, l'acide benzoïque et les lignanes, quercétine), les minéraux (par exemple, K, Mg, Ca et Na) et des hormones de croissance végétales (cytokinines, des auxines, des gibbérellines et de l'acide abscisique) (Godlewska *et al.*, 2016). Les extraits d'algues ont montré plusieurs effets de stimulation de différentes voies au niveau de la plante.

II.4.1. Effet sur la croissance et le développement des plantes

Les algues sont riches de plusieurs molécules bioactives telles que les antioxydants, les hormones de croissance végétale, les molécules osmoprotectantes, les nutriments minéraux et de nombreux autres composés organiques bioactives (Nabti *et al.*, 2016). Les extraits d'algues ont montré un potentiel très important de stimulation de la croissance des plantes. Cet effet est principalement dû aux hormones exogènes (cytokinines, auxines, gibbérellines) présentes dans ces extraits (Faessel & Morot-Gaudry, 2009; Khan, *et al.*, 2009 ; Rengasamy *et al.*, 2016). Une stimulation de la capacité photosynthétique permet un développement plus efficace en quantité et qualité des fruits, et une meilleure utilisation des oligoéléments présents dans les sols permet une qualité nutritionnelle améliorée des fruits et/ou des graines. Certaines molécules extraits des algues telles que les polysaccharides et les polyamines agissent sur la synthèse et l'activité des hormones endogènes (Faessel & Morot-Gaudry, 2009). La dégradation des chlorophylles est inhibée par certains composés, comme la glycine bêtaïne, pour favoriser une meilleure photosynthèse (Khan, *et al.*, 2009).

Plusieurs études ont indiqué que les extraits d'algues, même à faible concentration, sont capables d'induire une stimulation de la croissance et des réponses physiologiques liées à la

croissance des plantes et à l'accroissement du rendement (**Birceno-Domínguez et al., 2014**), l'amélioration de l'implantation des semis (**Hernández-Herrera et al., 2014**), la mobilisation et l'assimilation des nutriments et la teneur en chlorophylle (**Khan et al., 2009**) et la floraison et la qualité des fruits (**Craigie et al., 2011**).

II.4.2. Effet sur l'assimilation des nutriments

La composition biochimique des algues est très complexe, composée de plusieurs substances actives qui peuvent stimuler la nutrition par une meilleure biodisponibilité des éléments nutritifs et une meilleure absorption de ces derniers par la plante. Plusieurs études ont montré que les extraits d'algues influencent les propriétés physiques, biochimiques et biologiques du sol et peuvent également affecter l'architecture des racines des plantes facilitant l'absorption efficace des nutriments (**Anderson, G., 2009**). Des polysaccharides algaux ont montré des propriétés de conditionnement du sol et également des ions métalliques chélatent formant des polymères de haut poids moléculaire. Les extraits d'algues permettent la tolérance des plantes aux carences nutritives en azote en favorisant l'expression et/ou l'activité de la nitrate réductase grâce à certains composés (mannitol) (**Durand, et al., 2003; Phytoma, 2005**). Certaines molécules extraites des algues peuvent stimuler l'expression de phosphatases racinaires impliquées dans l'absorption du phosphate (**Klarzynski, et al., 2006**). Ces molécules peuvent aussi agir comme chélateurs des nutriments minéraux présents dans le sol (**Khan, et al., 2009; Calvo, et al., 2014**). La stimulation de l'absorption d'azote par la plante est une technique intéressante pour améliorer le taux de protéines dans les grains récoltés (**Phytoma, 2005**), ce qui reflète sur la qualité des récoltes. Enfin, les extraits d'algues ont un effet positif sur la structure physico-chimique et biologique du sol grâce à leur richesse en polysaccharides, qui maintiennent une bonne humidité et aération nécessaire pour l'installation du système racinaire et favorisant la croissance de bactéries bénéfiques à la croissance des plantes (**Khan, et al., 2009**). Les extraits d'algues sont également connus pour affecter la régulation des gènes qui ont joué un rôle important dans l'absorption des nutriments. Par exemple, l'extrait de *A. nodosum* a régulé à la hausse l'expression d'un gène NRT1.1 de transporteur de nitrate, ce qui a amélioré la détection de l'azote et le transport des auxines (**Krouk et al., 2010; Castaings et al., 2011**), et par conséquent l'amélioration de la croissance des racines latérales et une meilleure assimilation de l'azote.

II.4.3. Effets sur la résistance des plantes aux stress abiotiques

Les algues sont connues pour leur richesse en polysaccharides, minéraux, vitamines et aussi certaines substances bioactives comme les protéines, les lipides et les polyphénols. Plusieurs études ont révélé les avantages des extraits d'algues sur les plantes telle-que l'amélioration de la performance des cultures et le rendement et l'amélioration de la résistance au stress biotique et abiotique (Eyras *et al.*, 2008; Norrie et Keathley 2006).

Les extraits d'algues peuvent agir sur la régulation de la perturbation osmotique causé par les stress abiotiques comme la sécheresse ou la salinité, en stimulant les mécanismes antioxydants et les voies de la biosynthèse des osmo-régulateurs, comme la glycine bêtaïne, la proline (Khan, *et al.*, 2009). Les algues ont également la capacité d'améliorer la tolérance au stress chez nombreuses espèces de plantes par augmentation de la concentration des molécules bioactives, notamment des antioxydants dans les plantes (Fan *et al.*, 2011; Rayirath *et al.*, 2009). A titre d'exemple, une étude menée par Amira *et al.*, (2014) a montré la capacité d'extrait d'algues à diminuer l'effet négatif du stress salin de l'aubergine en Egypte. Les algues sont riches en biomolécules osmoprotecteurices tels que la proline, bêtaïne-glycine, les sucres,...etc, qui peuvent déclencher des réactions de la tolérance des plantes au stress salin. Plusieurs études ont montré que les extraits d'algues ont un effet de stimulation de la tolérance des plantes aux conditions du stress salin. L'étude d'Ibrahim 2016, a montré que les extraits des algues marines ont stimulé la croissance et les voies métabolique de la tolérance des plantes de blé au stress salin. L'extrait de l'*Ulva rigida* a permet l'atténuation de l'effet du stress salin sur les plantes de *sauge officinale*. Ce traitement a permis la réduction du taux de la bêtaïne-glycine causé par le stress salin et par conséquence la réduction de la perte d'eau dans les feuilles de la plante, ainsi la réduction des composés phénoliques. Cette étude a montré aussi, que ce traitement a permis l'induction de la biosynthèse des enzymes SOD et APX dans la plante (Mansori *et al.*, 2016).

II.5. Les microalgues au Maroc

La valorisation des microalgues n'a suscité l'attention de la communauté scientifique marocaine que récemment. La plupart des études des microalgues ont été focalisées sur la taxonomie et la prolifération des espèces toxiques sur les côtes marocaines (Abouabdellaha *et al.*, 2011; Akallal et Moradi, 2002; Bennouna *et al.*, 2000; Daoudi *et al.*, 2013; Elmadani *et al.*, 2001; Taleb *et al.*, 2001).

Pour la valorisation des microalgues, quelques études ont été faites, notamment, l'étude de **Akallal et al., 2007** qui ont étudié les conditions de culture de *Dunaliella salina* pour la production du bêta-carotène. Ainsi que l'étude de **Mouradi et al., 2014** sur la caractérisation des polysaccharides extracellulaire de *Porphyridium sp* pour une éventuelle valorisation. Ainsi quelques travaux sur la valorisation des microalgues dans le domaine de l'alimentation et la santé humaine (**Amine et al., 2014a, 2016b ;Haimeur et al., 2012a, 2016b ; Mimouni et al., 2015**).

Au Maroc, les microalgues ont connus un intérêt économique pour les industriels. Plusieurs entreprises sont installées au Maroc pour la culture des microalgues principalement pour la nutrition humaine. On cite la société BIO3 à Dakhla, Vitalgue à Marrakech, Vitalina à Agadir et le domaine spiruline à Temarra. Mais jusqu'a maintenant la Spiruline "*Arthrospira platensis*" reste la seule espèce cultivée industriellement au Maroc, sinon la société domaine spiruline de temarra a initié la culture de *Chlorella vulgaris* dans des bassins sous serre. Le Maroc avec un climat idéal pour la culture des microalgues à grande échelle, surtout dans le sud du royaume pourrait motiver les investisseurs à développer le secteur des microalgues.

II.6. Espèces de microalgues étudiées

L'activité biologique des microalgues est liée principalement au profil biochimique de la biomasse. La richesse de certaines microalgues en acides aminés, vitamines et autres molécules de différentes natures (hormones, sidérophores...) leur procure une vertu stimulante pour les plantes. Les microalgues choisies pour cette étude contiennent un pourcentage élevé en macronutriments et une quantité intéressante en microéléments, acides aminés, polysaccharides, et vitamines.

II.6.1. Les critères de choix des souches microalgues

1. Les souches choisies pour cette étude appartiennent aux genres de microalgues marines et d'eau douce les plus étudiées et cultivées au niveau mondial,
2. Les genres et souches choisies sont connus pour avoir un bon profil biochimique. Le profil et la composition de la biomasse microalgale varie pour une même espèce selon le régime et les conditions de cultures,
3. Ces souches ont une bonne croissance et une culture relativement facile adaptable au niveau industriel,

4. La plupart de ces souches, ont été déjà décrites pour leur culture en bassins ouverts (**Fon Sing, 2010 ; Rekha et al., 2012, Bellou et Aggilis, 2012 ; Torzillo et al., 2012 ; Chen et al., 2013**), et dont certaines (*Spirulina platensis*, *Dunaliella salina*, *Nannochloropsis gaditana*, *Isochrysis* sp., *Phaeodactylum tricornutum*) sont des espèces cultivées à grande échelle à des fins commerciales (**Rosenberg et al., 2008; Priyadarshani and Rath, 2012**).

II.6.2. Description des souches étudiées

Six espèces microalgues ont été choisies pour cette étude dont 4 marines (*Isochrysis* sp, *Nannochloropsis gaditana*, *Dunaliella salina* et *Phaeodactylum tricornutum*), une espèce d'eau douce (*Chlorella* sp) et une cyanobactérie d'eau douce (*Arthrospira platensis*).

II.6.2.1. *Chlorella* sp

Chlorella (figure 5) sp appartient à la lignée des Chlorophytes. Le genre *Chlorella* se retrouve dans tous les habitats aquatiques, marins ou d'eau douce. Il fut découvert en 1890 par un microbiologiste hollandais Martinus Willem Beijerinck. *Chlorella* est une algue verte unicellulaire eucaryote d'eau douce. Elle est de forme ronde ou ellipsoïde, d'un diamètre moyen de 5 µm. Elle possède un chloroplaste pariétal contenant de la chlorophylle *a* et *b* ainsi que des caroténoïdes comme pigments accessoires, un pyrénoloïde, des thylakoïdes, des grains d'amidons et du matériel génétique. L'amidon est la réserve majeure de glucides de la cellule. D'autres organites sont également présents dans la cellule : un noyau, des mitochondries, de petites vacuoles, des gouttelettes lipidiques, des ribosomes. La membrane cellulaire externe est composée de trois membranes contenant de la glucosamine (**Takeda, 1993 ; Allard et al., 2000**).

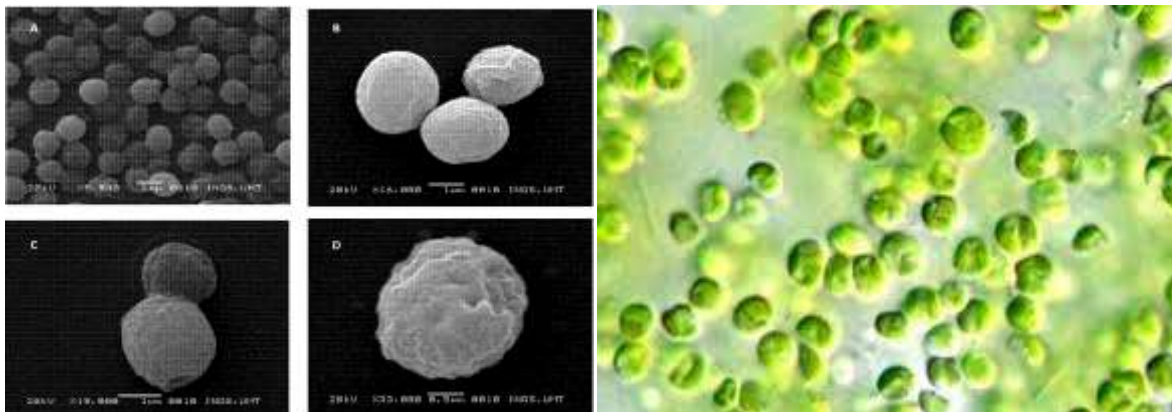


Figure 5: Image illustre la forme de *Chlorella* sp.
 image gauche *Chlorella* sp MEB, Kassim et al., 2014/ Image droite *Chlorella* sp microscope optique,
<http://www.thalgo.in/algues/index.0-n.html>)

II.6.2.2. *Nannochloropsis gaditana*

Nannochloropsis gaditana (figure 6) appartient à la classe des Eustigmatophycées. Les espèces du genre *Nannochloropsis* sont sub-sphériques de 2 à 4 µm de diamètre ou cylindriques de 3 à 4 × 1,5 µm (Antia & Cheng, 1982). Les Eustigmatophycées appartiennent à la lignée brune des microalgues marines. Les pigments majoritairement retrouvés chez ces microalgues sont la chlorophylle *a*, la violaxanthine et le β-carotène.

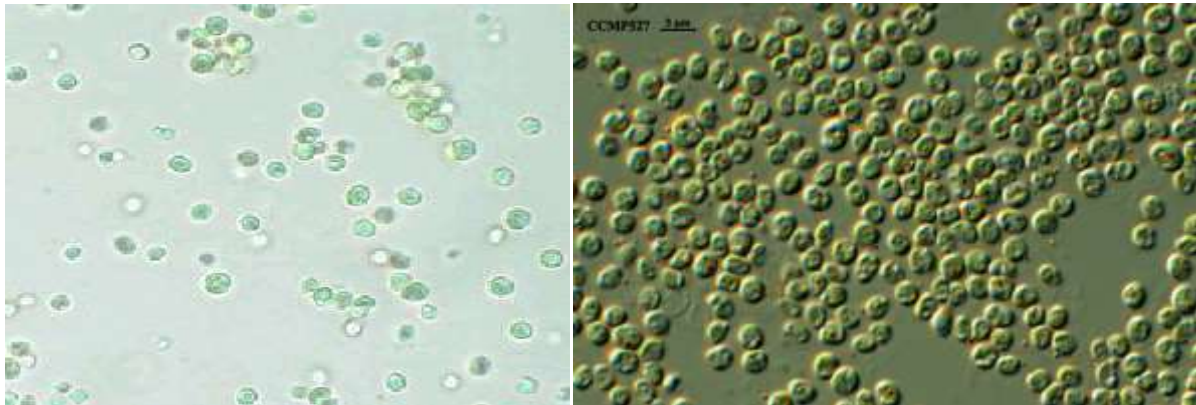


Figure 6: images de *Nannochloropsis gaditana*
<http://cfb.unh.edu/>

II.6.2.3. *Isochrysis* sp

Le genre *Isochrysis* (figure 7) appartient à l'ordre des Isochrysidales, défini par Pascher en 1910. L'espèce *I. galbana* a été identifiée pour la première fois par Bruce, Knight et Parke en 1939. C'est une algue mobile qui possède deux flagelles lisses, égaux, insérés apicalement et dont l'haptonème est réduit. La cellule est recouverte d'écailles organiques à la différence de l'espèce voisine *Emiliania huxleyi* dont les écailles organiques sont, en plus, recouvertes d'un dépôt calcaire constituant des structures particulières, les coccolites.



Figure 7: Image illustre la forme d'*Isochrysis galbana*.

Image (gauche) microscope optique *Isochrysis galbana* <http://www.algaelink.nl/>. Photo droite *I. galbana* SEM X2200. Dennis Kunkel, 2009)

II.6.2.4. *Phaeodactylum tricornutum*

Phaeodactylum tricornutum (figure 8) est la seule espèce du genre *Phaeodactylum* et, contrairement à d'autres diatomées, elle peut présenter différents morphotypes (ovale, fusiforme et tri-radié). Les changements de forme de la cellule peuvent être stimulés par les conditions environnementales. Cette fonctionnalité est utilisée pour explorer les bases moléculaires de contrôle de la forme des cellules et la morphogénèse. Les données qui découleront du séquençage complet du génome de la diatomée *P. tricornutum* fourniront les informations de base pour étudier les questions importantes de la biologie des diatomées. De plus les connaissances sur les gènes de *P. tricornutum* faciliteront l'utilisation de cet organisme comme cellule potentielle pour l'expression de gènes d'autres algues brunes, intéressants pour l'industrie.



Figure 8: Photo *Phaeodactylum tricornutum*.

<https://ncma.bigelow.org/> <https://utex.org/>

II.6.2.5. *Dunaliella salina*

Découverte par un scientifique français en 1838 dans le salin d'Aigues-Mortes, la *D. salina* (figure 9) est une micro-algue halophile unicellulaire de la classe Chlorophycée, vivant exclusivement dans les eaux salines. Afin de survivre dans ce milieu extrême, elle produit une concentration exceptionnelle de caroténoïdes à fort pouvoir antioxydant, 10 fois plus active que le bêta-carotène de synthèse. Cette superproduction biologique est une réaction naturelle de l'algue pour se protéger de la lumière intense (forte exposition aux UV). De la même façon, la micro-algue fabrique des acides gras polyinsaturés et du glycérol, qui lui fournissent une protection contre la pression osmotique due au milieu hyper-halin.

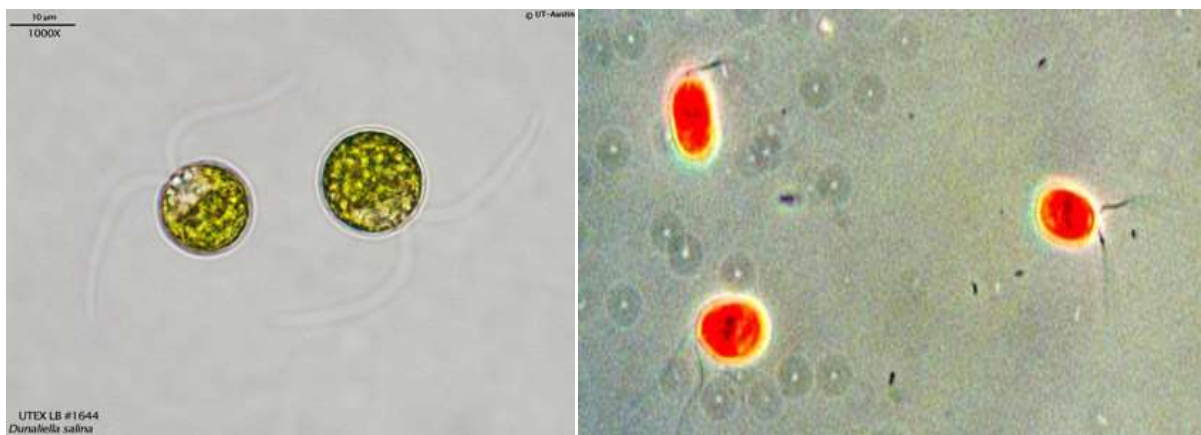


Figure 9 : Images illustrent la forme de *Dunaliella salina* dans les différentes conditions. Image gauche *Dunaliella salina* dans des conditions normales. <https://utex.org/>; Image droite *D. salina* dans le cas du stress salin. <http://saline-varan.blogspot.com/>

II.6.2.6. Spiruline (*A. platensis*)

La spiruline (figure 10) est une cyanobactérie ou algues bleu-vert, compte parmi les plus anciennes formes de vie sur terre. Parmi les cyanobactéries on trouve le genre nommé *Spirulina* ou *Arthrospira* contient une souche particulièrement intéressante dénommé *Spirulina platensis* ou (*Arthrospira platensis*) plus connue sous le nom Spiruline. Consommée depuis des siècles par certains peuples primitifs d'Afrique et d'Amérique, et connue par les scientifiques depuis plusieurs décennies pour sa richesse nutritionnelle, elle fait l'objet d'une redécouverte depuis quelques années. Elle est très riche en protéines, lipides, glucides, sels minéraux et vitamines.

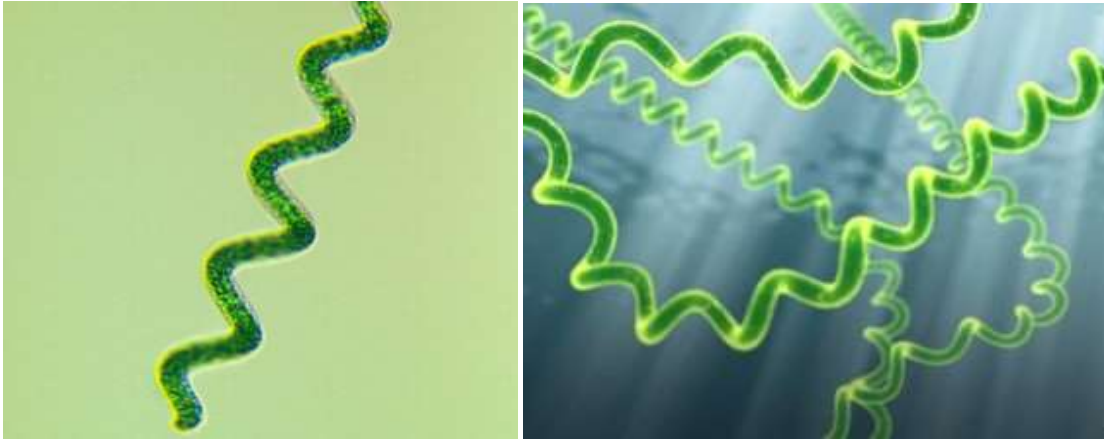


Figure 10: Arthrospira platensis microscope optique
<http://algae-lab.com/>; <http://blog.dlahn.com/spirulina-protein/>

Problématique Contexte général :

Le Maroc, comme pays émergent, a opté pour le développement agricole en tant que moteur du développement économique et social. Cependant, les activités agricoles au Maroc exercent à l'heure actuelle une forte pression sur le sol, l'eau et la biodiversité. Ceci est principalement dû à l'utilisation incontrôlée des engrais chimiques et des pesticides.

Ces produits chimiques limitent fortement les rendements et menacent la productivité des terres dans les régions arides et semi-arides, notamment en cultures irriguées, ce qui entraîne une réduction des surfaces cultivables. Ils représentent une menace pour l'équilibre alimentaire de ces régions. A titre d'exemple, le problème de la salinité des sols au Maroc qui constitue un des facteurs majeurs limitant les rendements des productions céréalières. Selon **Ashraf (1994)** et **Subbaro & Johansen (1994)**, la salinité des sols compte parmi les principaux facteurs limitant de la production céréalière. L'agriculture moderne est donc à la recherche de nouvelles solutions biotechnologiques qui permettraient une réduction de l'utilisation des intrants chimiques sans affecter le rendement des cultures, ni le revenu des agriculteurs (**Doucet, 1992**).

Les producteurs sont de plus en plus incités à opter pour des pratiques de production durables. Parmi les pratiques de gestion saine, ils ont maintenant accès, entre autres, à un vaste choix de produits appelés biostimulants.

Dans ce contexte, plusieurs produits et substances qui visent à améliorer le fonctionnement du sol, de la plante ou des interactions entre sol et plante sont apparus comme des alternatives aux produits chimiques. Il s'agit d'une catégorie très large de produits et substances qui apportent des solutions souvent innovantes dans le domaine de la fertilisation et de la protection des cultures en stimulant les processus biologiques au niveau du sol ou de la plante (par exemple: stimulation de la tolérance des plantes aux stress abiotiques ou meilleure absorption des nutriments, ...).

Les microalgues représentent une source renouvelable en substances bioactives qui pourront être bénéfiques aux cultures agricoles. Ces substances peuvent être des promoteurs de croissance et des stimulateurs de la tolérance des plantes aux stress abiotique.

Ces microorganismes présentent une grande biodiversité qui pourra être criblée pour plusieurs applications. Le Maroc avec un littoral de 3500km de longueur et un climat idéal pour la culture des microalgues, ainsi que la disponibilité des surfaces non agricoles surtout au sud du Royaume permet un développement optimal de la culture des microalgues. Toutes ces

conditions pourront être exploitées pour le développement de cette bio-économie à l'échelle industrielle au Maroc.

Dans ce contexte, ce projet vise l'exploration de cette richesse en microalgues, pour le développement de biostimulants de la croissance et la tolérance des plantes au stress salin.

Objectifs de la thèse :

La présente étude vise à évaluer le potentiel biochimique des microalgues pour la stimulation des plantes et l'amélioration de la performance de l'agriculture durable. Cette évaluation, reposant sur les points suivants :

- ✓ L'étude de l'effet des extraits de microalgues sur la stimulation de la vitesse de la germination des graines de blé, tomate et poivron
- ✓ L'étude de l'effet des extraits de microalgues sur la croissance des trois plantes choisies pour cette étude (tomate, blé et poivron)
- ✓ L'étude de l'effet des exopolysaccharides extraits des microalgues sur la germination et la croissance des plantes
- ✓ L'étude approfondie sur l'effet du stress salin sur la croissance et la biochimie de la microalgue halophile *Dunaliella salina* comme espèce modèle des chlorophycées la plus proche aux plantes terrestres, pour détecter les mécanismes biochimique de la tolérance de cette microalgue au stress salin, dans le but d'étudier la possibilité d'exploiter leur potentiel biochimique pour la stimulation de la tolérance des plantes au stress salin.
- ✓ L'étude de l'effet des extraits de la microalgue halophile *D. salina* cultivée dans des salinités élevées sur la stimulation de la germination et la croissance des plantes dans les conditions du stress salin.



MATERIEL ET METHODES

I. Matériel Biologique et Conditions de culture

I.1. Les microalgues

Les souches microalgues choisies (Tableau 4) pour cette étude sont des souches marocaines appartenant à la collection MAScIR. Elles ont été isolées et caractérisées dans les laboratoires MAScIR en collaboration avec le laboratoire des phytoplanctons de l'Institut National de Recherche Halieutique (INRH) de Casablanca.

Le choix de ces espèces a été conditionné par le souci d'utiliser au maximum les données disponibles pour ces souches et qui peuvent être utiles pour les interprétations ultérieures de nos résultats, ainsi que par l'intérêt scientifique et industriel de ces souches dans le marché des microalgues.

Tableau 3: Souches microalgues et origines d'isolement

Souches	Classes	Lieu d'isolement	Nature
<i>Nannochloropsis gaditana</i> MS021	Des <i>Eustigmatophycées</i>	lagune Oualidia	Espèce marine
<i>Dunaliella salina</i> MS002	Des <i>Chlorophycées</i>	Saline d'Azilla	Espèce marine
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> MS007	Des <i>Bacillariophycées</i>	Plage de M'diq	Espèce marine
<i>Isochrysis sp</i> MS051	Des <i>Prymnesiophycées</i>	Dakhla	Espèce marine
<i>Chlorella sp</i> MS077	Des <i>Chlorophycées</i>	Lac Sidi Boughaba	Espèce d'eau douce
<i>Spirulina platensis</i> MS099	Des <i>Cyanophycées</i>	Foum Iwad Laayoune	Espèce d'eau douce

Ces souches ont été isolées par la méthode de dilution en série et la méthode de repicage sur gélatine d'agar. Avant de la conservation, ces souches ont été traitées par une solution d'antibiotiques pour l'élimination de la contamination bactérienne. Ces souches ont été conservées en deux modes de conservation, une copie de la collection a été incubée à faible intensité lumineuse pour réduire la division cellulaire, ainsi une dilution du milieu avec 1/2 pour réduire la disponibilité des nutriments à une température de 18°C.

Les deux paramètres importants pour la culture des microalgues ont été optimisés : le milieu de culture et la température.

Pour le choix du milieu de culture optimal pour chaque souche nous avons comparé deux milieux pour chaque souche microalgues. Trois températures ont été testées pour toutes les souches tandis que pour la spiruline, 4 températures différentes ont été étudiées (le tableau 5).

Tableau 4: Milieux de culture des souches microalgues

Souches	Milieu de culture	Température	pH
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	Milieu f/2 (voir annexe 1)	Trois températures ont	7.8
<i>Dunaliella salina</i>	Et Milieu Walne (voir annexe 2)	été testées pour les	
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	NB: pour <i>P.tricornutum</i> on	souches marines : 20,	
<i>Isochrysis sp</i>	ajoute la silice	25 et 30°C	
<i>Chlorella sp</i>	Milieu BBM et Milieu BG-11 (voir annexe)	20, 25 et 30°C	8.2
<i>Spirulina platensis</i>	Milieu Zarrouk et Milieu <i>Spirulina</i> medium (voir annexe)	20, 25, 30 et 35°C	10

I.1.1. Culture en Erlenmeyers.

Les souches sont cultivées dans des Erlenmeyers de 500 mL contenant 200 mL de milieu de culture. Le milieu est inoculé stérilement avec 20 mL d'une pré-culture âgée de 7 jours. Les pré-cultures et les cultures sont placées à 25 °C en chambre d'incubation sous agitation (photo-incubateur agitateur) avec un éclairage de 5000 lux en photopériode de 12h/12h.

I.1.2. Culture en photobioréacteur

Un photobioréacteur (Sartorius BIOSTAT® PBR) (figure 11 et 12) contrôlé a été utilisé pour la confirmation et la validation des conditions de culture optimales des deux souches retenues du premier criblage sur la stimulation de la germination et la croissance de la tomate. Le PBR permet avant tout autre avantage de maintenir les conditions et assurer la stérilité de la culture. Notre objectif dans cette étude est l'optimisation de la culture des souches choisies pour ce projet dans des conditions contrôlées en premier temps et la validation des résultats de la culture de chaque souche dans les différentes conditions.

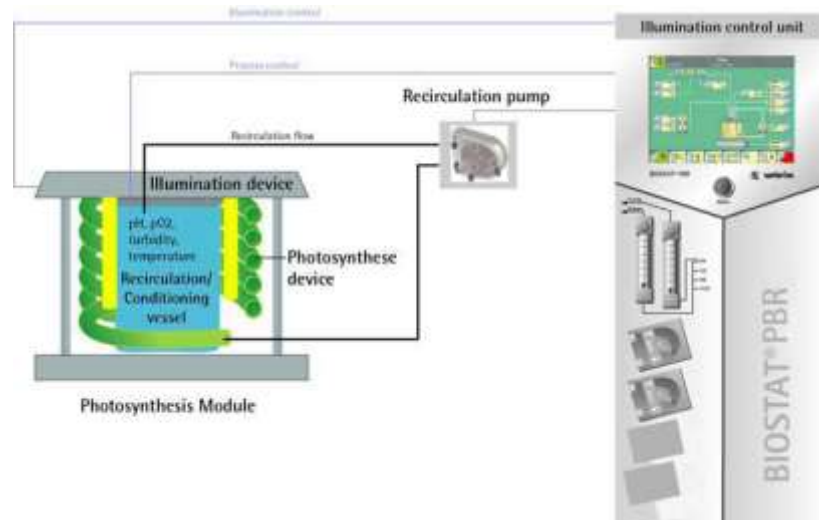


Figure 11: Schéma simplifié d'un PBR BIOSTAT®

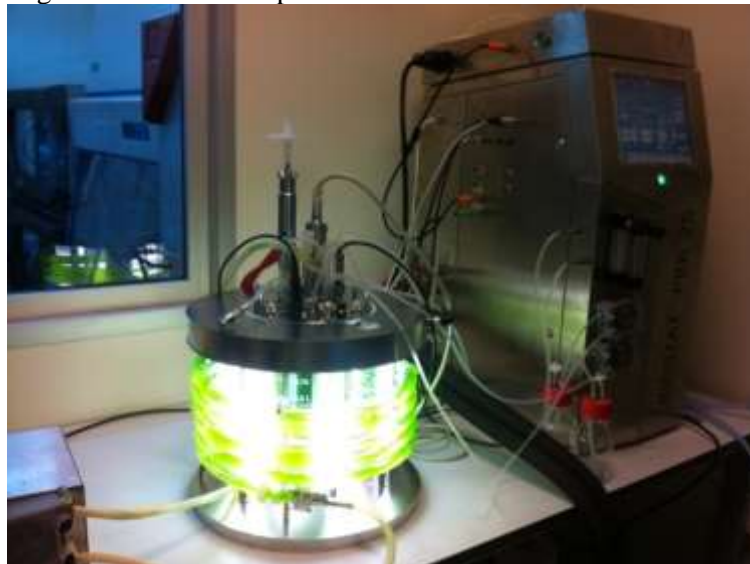


Figure 12 : Image photographique d'un PBR BIOSTAT®

Une stérilisation du photobioréacteur ainsi que le milieu de culture (le milieu nutritif contenant tous les éléments nécessaires à la croissance) a été réalisé avant d'y introduire l'inoculum (la quantité initiale de cellules de la souche à cultiver 1:5). La meilleure solution est généralement une stérilisation par autoclave à (121°C pendant au moins 20 min). Il faut ensuite bien veiller à garder cette stérilité chaque fois que l'on désire ajouter des intrants.

Deux autres paramètres extrêmement variables et donc importants, mais qui sont en général surveillés sont le pH et la température. Le maintien de la valeur de ces paramètres est nécessaire, ce qui exige des mécanismes régulateurs. On utilise toujours pour cela un capteur et un actionneur. Le capteur mesure la grandeur que l'on souhaite réguler (la température ou le pH), et

l'actionneur permet d'agir pour corriger un éventuel écart observé avec une consigne (respectivement une électrovanne laissant circuler un liquide chaud ou froid, ou une pompe envoyant un acide ou une base).

I.1.3. Suivi de la croissance des cultures et la récolte de la biomasse

Le suivi de la croissance des cultures est réalisé en prélevant un échantillon chaque deux jours dont l'absorption est mesurée à 680 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le suivi de l'évolution de la productivité de biomasse est effectué en prélevant 10ml de culture tous les 2 jours, centrifugé à 3000rpm pendant 10min et lyophilisée avant la pesée par la balance de précision.

I.1.4. Amélioration de la productivité des deux souches retenues par l'addition du CO₂

Les deux souches retenues après le premier criblage sur la stimulation de la germination et la croissance de la tomate ont été cultivées dans un photobioréacteur 2L dans les conditions optimales pour l'évaluation de l'effet de l'addition du CO₂ sur la croissance et la production en biomasse. Trois pourcentages du CO₂ ont été étudiés : 0%, 1% et 3% par rapport à l'air comprimé.

I.2. Matériel végétal et conditions de culture

Nos expérimentations ont été effectuées sur trois plantes pour évaluer l'activité des différents extraits des microalgues choisies. Le choix des plantes a été basé sur les critères suivants :

- La tomate est une plante modèle des solanacées qui se caractérise avec un cycle de croissance courte, un génome totalement séquencé, ainsi avec une grande importance de ces plantes au niveau de l'agriculture Marocaine.
- Le choix du poivron c'est pour voir la stabilité des produits développés sur la réponse des solanacées en comparaison avec la tomate, ainsi que le choix de cette plante a été basé aussi sur la sensibilité de cette plante aux stress biotiques et abiotiques
- Le blé est une plante modèle pour les cultures de grand champ, ainsi leur importance économique au Maroc puisque c'est la plante la plus cultivée au Maroc. Ainsi ce choix a été fait pour élargir le spectre de l'étude de ce traitement sur les plantes

I.2.1. Les plantes étudiées

- ✓ Tomate *Solanum lycopersicum L. Var. metro*
- ✓ Poivron *Capsicum annuum. var. andalus*

✓ Blé *Triticuma estivum* var. *Amal*

I.2.2. Conditions de culture des plantes

Les graines sont mises à germer dans des boîtes de pétri et incubées à l'obscurité à 25°C. Après la germination des graines, les plantules sont transplantées dans des pots contenant un mélange de tourbe et de sable à raison de 80:20 v/v. Les pots sont placés dans une chambre de culture sous des conditions de température et d'éclairement contrôlées. La température est de 25 °C, et une luminosité de 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ avec une photopériode de 16/8h jour/nuit. Application du stress salin.

I.2.3. Culture de *D. salina* dans les conditions du stress salin

Cette étude a porté sur *D. salina* cultivée à des concentrations élevées de salinité, comme une espèce chlorophycée très proche des plantes terrestres. Cette microalgue nous permettra de comprendre son mécanisme de tolérance au stress salin, dans le but de valoriser les molécules biochimiques qui interviennent dans cette tolérance pour la stimulation de la germination et la croissance des plantes dans les sols salins.

Un photobioréacteur de 2L a été utilisé pour la culture de cette microalgue dans les conditions de culture optimales déjà identifiées (milieu de culture Walne, 25°C, pH: 7.8, luminosité de 5000lux, 1% CO₂), avec 4 niveaux de salinité (0.5, 1, 2, 4M NaCl) pendant 14 jours. La croissance a été suivie en mesurant la densité optique chaque 2 jours.

I.2.4. Application du stress salin sur les graines

Cette expérience a été faite sur les trois plantes décrites précédemment (blé, tomate, poivron), dans des boîtes de pétri selon le programme suivant :

- 5 boîtes (20 graines par boîte) dans l'eau distillée (contrôle)
- 5 boîtes (20 graines par boîte) dans une solution de l'extrait de microalgues
- 5 boîtes (20 graines par boîte) dans l'eau distillée avec 3g/L NaCl
- 5 boîtes (20 graines par boîte) dans l'eau distillée avec 6g/L NaCl
- 5 boîtes (20 graines par boîte) dans l'eau distillée avec 3g/L NaCl + Extrait d'algues
- 5 boîtes (20 graines par boîte) dans l'eau distillée avec 6g/L NaCl + Extrait d'algues

Toutes ces expériences ont été réalisées trois fois indépendantes.

Pour chaque variété, 100graines (5boites de 20graines) par traitement, sont désinfectées à l'eau de javel, lavées abondamment à l'eau, puis rincées à l'eau distillée. Elles sont ensuite mises à germer dans des boites de pétri couvertes de papier filtres. Les boites ont été incubées à 25°C pendant 7jour. Chaque jour les graines germées par boites ont été comptées. Après le 7^{ème} jours le calcul du taux de la germination a été fait, ainsi que les paramètres morphologiques des plantules ont été mesurés (taille partie foliaire et racinaire des plantules), dosage de la proline, dosage du taux de la chlorophylle, dosage de l'anthocyanine, et l'activité des enzymes (POD, Catalase, SOD).

I.2.5. Application du stress salin sur les plantes

L'effet des extraits de la microalgue halophile *D. salina* sur l'atténuation du stress salin des plantes a été étudié selon le protocole suivant :

- 15 plantes témoins cultivées dans un mélange sol/tourbe (80/20)
- 15 plantes cultivées dans un mélange sol/tourbe (80/20) traitées par l'extrait de microalgues (témoin)
- 15 plantes cultivées dans une mélange sol/tourbe (80/20) avec 3g/Kg NaCl
- 15 plantes cultivées dans une mélange sol/tourbe (80/20) avec 6g/Kg NaCl
- 15 plantes cultivées dans une mélange sol/tourbe (80/20) avec 3g/Kg NaCl + Extrait d'algue
- 15 plantes cultivées dans une mélange sol/tourbe (80/20) avec 6g/Kg NaCl+ Extrait d'algue

Trois répétitions des expérimentations indépendantes ont été faite pour la confirmation du résultat et pour l'étude statistique.

Les plantes ont été mises dans un phytotron à 25°C, à 68% d'humidité et 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luminosité, pendant 60 jours.

Trois traitements par extrait de microalgues ont été effectués selon ce programme : un 1^{er} traitement après transplantation des plantules, un 2^{ème} après 20jours et le 3^{ème} après 40 jours de transplantation des plantes.

Après la récolte des plantes plusieurs paramètres ont été mesurés tels que la taille et le poids de la partie aérienne et racinaire des plantes, le dosage de la proline, le dosage du taux de la

chlorophylle, le dosage de l'anthocyanine, et de l'activité des enzymes (POD, APEX, Catalase, SOD).

II. Méthodes d'analyses

II.1. Analyse de lipides des microalgues

II.1.1. Extraction et dosage des lipides

L'extraction des lipides totaux est réalisée selon un protocole modifié de **Bligh et Dyer (1959)**. La biomasse lyophilisée à -80 °C est réhydratée avec l'eau additionnée avec 2% de BHT, puis traitée par ultrasons (Branson Sonifier 450) à 40 KHz pendant 15 min à température ambiante. Les lipides sont extraits en utilisant un mélange d'eau / chloroforme / méthanol (0.8/2/1) et l'extrait est centrifugé à 5000 rpm pendant 5 min. La phase inférieure est récupérée et la phase supérieure subit une deuxième extraction pour extraire le maximum de lipide. Une solution d'eau physiologique (0,9 % NaCl) est mélangée à la phase organique (5:1 v /v) puis la séparation se fait par une ampoule à décanter. Le chloroforme est évaporé à l'aide d'azote et les lipides sont finalement pesés pour mesurer leur poids.

II.1.2. Analyse du profil lipidique par GC-MS

Les lipides totaux ont subi une transestérification basique en utilisant le KOH 4% et le méthanol 1:40. La réaction a été réalisée sous ultrason pendant 40 min. Les esters méthyliques d'acides gras ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse (Agilent 7890A Series GC) couplée à la spectroscopie de masse. L'analyse des échantillons a été réalisée à l'aide d'un injecteur multimode dans la colonne 5-ms de dimension 30m x 250 µm x 0,25 µm et l'ionisation est assurée par impacte électronique.

La composition en esters méthyliques d'acides gras a été calculée par rapport aux totales d'esters. Les données ont été analysées par la base de données NIST 2011 MS. Le C10:0 a été utilisé comme standard interne.

II.2. Analyse des sucres totaux

Le dosage des carbohydrates repose sur la condensation des produits de dégradation des sucres. L'acide sulfurique concentré transforme à chaud les glucides en dérivés furfuriques qui donnent avec le phénol une coloration verte (solution diluée) à bleu (solution concentrée) dont l'intensité

est mesurée par spectrophotométrie à 492 nm. La détermination de la teneur correspondante est effectuée à l'aide de la courbe d'étalonnage.

II.3. Analyse des protéines

La méthode modifiée d'extraction des protéines utilisée est basée sur celle décrite par **Price et Slocombe**. 10 mg de biomasse algale lyophilisée a été remise en suspension sous agitation dans NaOH (4M), les homogénats ont subi une série de traitements : incubation à 95°C, refroidissement à 0°C et agitation plusieurs fois avant un traitement par ultrasons pendant 30 min. Les homogénats ont été centrifugés à 15000 rpm. Le surnageant a été récupéré et le culot est homogénéisé dans du Tris-HCl, avant de le centrifuger à 15000 rpm. Les deux surnageants ont été mélangés avant de passer à la précipitation des protéines par l'acide trichloracétique 25% (**Price et al., 1965 ; Slocombe et al., 2013**).

La quantification des protéines a été réalisée par la méthode de **Bradford (Bradford, 1976)**. Des courbes d'étalonnage ont été préparées pour chaque essai avec l'albumine de sérum bovin (BSA).

II.4. Analyse des éléments chimiques NPK

Les analyses du contenu en N, P et K dans les biomasses ont été réalisées par la technique d'Analyse par Injection en Flux continu (FIP) par un analyseur en flux continu SKALAR.

II.4.1. Détermination de l'azote total

Une digestion de l'échantillon est effectuée à une température de 380°C par un mélange réactionnel contenant le sulfate de mercure, sulfate de potassium et l'acide sulfurique dans le but de transformer la totalité de l'azote organique en ammonium.

La détermination de l'ammonium est basée sur la réaction de Berthelot modifiée ; dans un milieu tampon alcalin, l'azote ammoniacal chauffé en présence de salicylate et d'hypochlorite, forme un complexe vert dont l'absorbance à 660nm est proportionnelle à la concentration d'azote ammoniacal. L'intensité de la coloration peut être augmentée par l'addition de nitroprussiate de sodium

II.4.2. Détermination des Ortho-phosphates

Dans un milieu acide, l'anion orthophosphate réagit avec le molybdate d'ammonium pour former l'acide phosphomolybdique. La réaction de ce dernier avec l'acide ascorbique donne le bleu de molybdène, dont l'absorbance à 880 nm est proportionnelle à la concentration de phosphore.

II.4.3. Détermination de potassium

Le potassium dans la biomasse des microalgues a été analysé après la digestion acide de la biomasse algale par photomètre de flamme couplé avec l'analyseur en flux continu SKALAR.

II.3. Caractérisation biochimique de la microalgue *Halophile D. salina* cultivée dans les conditions du stress salin

II.3.1. Dosage de la proline dans la biomasse de *D. salina*

La proline est déterminée par une méthode rapide développée par **Singh**: 1ml de surnageant, 4ml de solution de ninhydrine, 4ml d'acide acétique glacial et 1ml d'eau distillée sont mis dans des tubes de centrifugation de 10 ml. Ce mélange est chauffé au bain marie (90°C) pendant 45mn et refroidi à la température ambiante. L'absorbance est lue à 520 nm (**Singh et al. 1973**).

II.3.2. Dosage des Chlorophylles et Caroténoïdes dans la biomasse de *D. salina*

Les chlorophylles *a* et *b* sont déterminées selon la méthode de **Arnon (Arnon, 1949)**. 0,5g de biomasse sèche de chaque échantillon sont broyées et homogénéisées dans 10ml d'acétone à 80% et conservés à 4°C pendant une nuit. L'extrait organique est centrifugé à 14000rpm/ 5mn et l'absorbance du surnageant est mesurée à 663 et 645 nm pour déterminer la chlorophylle *a* et la chlorophylle *b* respectivement. L'équation de **Miazek** a été utilisée pour la détermination des caroténoïdes (**Miazek, 2013**).

$$CH a \text{ (mg/l)} = 12,41 DO (663) - 2,59 DO(645).$$

$$CH b \text{ (mg/l)} = 22,9 DO(645) - 4,68 DO(663).$$

$$CH t = CH a + CH b$$

CH a: concentration en chlorophylle *a*.

CH b: concentration en chlorophylle *b*.

CH t: concentration en chlorophylle totale

$$\text{Carotenoids}_{\text{total}} = (1000 \times A_{470} - 1,63 \times \text{chl}a - 104,96 \times \text{chl}b) / 221.$$

II.3.3. Dosage des polysaccharides de *D. salina*

Des milieux de culture (1L) de *D. salina* de différents niveaux de salinité ont été chauffés à 95°C sous agitation pendant 2h. Après la centrifugation du mélange à 4000rpm pendant 10min, le surnageant a été concentré par la rota-vapeur à 60°C avant de précipiter les polysaccharides par l'éthanol (surnageant/éthanol 1/2(V/V) à 4°C pendant 12h. Une centrifugation à 4500rpm

pendant 15 min a été faite pour la récupération des polysaccharides. Ces polysaccharides ont été lavés par l'éthanol pure 3 fois et ont été congelés à -80°C avant la lyophilisation et la pesée.

II.4. Préparation des extraits des microalgues

Les deux souches microalgues retenues (*D. salina* et *A. platensis*) du premier criblage ont été utilisées pour la préparation des différents extraits nécessaires pour l'étude de stimulation des plantes.

II.4.1. Hydrolyse de la biomasse des microalgues

La biomasse algale est traitée ensuite par l'acide sulfurique dans un extracteur à reflux. La concentration de l'acide sulfurique et le temps de traitement ont été optimisés. Les conditions optimales utilisées sont 0.5 % d'acide sulfurique pendant 50 min à 90°C.

II.4.2. Extraction et caractérisation des polysaccharides

Pour l'optimisation de l'extraction des polysaccharides nous avons utilisé la méthode de **Chaiklahan** modifiée. Une étape de dépigmentation de la biomasse avec l'acétone est nécessaire durant 12h sous agitation. Le mélange est filtré, puis rincé par l'éthanol absolu jusqu'à disparition de la couleur verte qui traduit l'élimination des chlorophylles. Le résidu est ensuite dépigmenté par l'éthanol absolu bouillant pendant 1 h. Cette étape est répétée 2 fois et, entre chaque étape de dépigmentation, le mélange est filtré et rincé par de l'éthanol absolu jusqu'à disparition de la coloration. Le résidu ainsi obtenu est lyophilisé puis pesé (**Chaiklahan et al., 2013**).

Nous avons utilisé la biomasse algale dans une grandeur de 1g de biomasse sèche dans 50ml d'eau distillée sous agitation pendant 30min, avant de passer au chauffage à 90°C sous agitation de 400rpm, pour l'optimisation du temps d'incubation dans cette température nous avons testé 4 temps (1, 2, 3 et 4h). Dans cette étude nous avons testé aussi l'extraction par autoclave (121°C, 30min). Après le refroidissement des mélanges, nous avons séparé les résidus de la biomasse par centrifugation à 4500rpm pendant 10min, après la récupération du surnageant, on a répété l'extraction sur les résidus de la biomasse pour la deuxième fois. Après centrifugation les deux surnageants sont regroupés.

Pour la récupération des exopolysaccharides libérés dans le milieu de culture, de microalgues une étape de précipitation par l'éthanol (Milieu de culture/éthanol : 1/3 :v/v) a été faite, suivie par une centrifugation à 3000rpm pendant 10min, les polysaccharides ont été lavés par l'éthanol pur 3fois, avant de les stocker à -80°C.

II.4.2.1. Dosage des sucres totaux dans les polysaccharides

Les sucres ont été dosés par la méthode de Dubois (Dubois, 1956). Les solutions de polysaccharide à doser, de concentrations comprises entre 5 et 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ainsi que des solutions de glucose et d'acide glucuronique constitutives de la gamme étalon sont préparées simultanément. A 200 μL des solutions à doser ou de gamme étalon, on ajoute 200 μL d'une solution aqueuse de phénol à 5 %. Le mélange est homogénéisé au vortex et 1mL d'acide sulfurique concentré est rapidement introduit à la pipette dans le milieu réactionnel. Après homogénéisation au vortex, le mélange est porté au bain-marie à 100°C durant 5 minutes. Les tubes sont refroidis dans un bain de glace et placés 30 minutes à l'obscurité. Les densités optiques sont par la suite mesurées à 492 nm sur un spectrophotomètre UV-visible.

II.4.2.2. Dosage colorimétrique des acides uroniques dans les polysaccharides des microalgues retenues

Les solutions de polysaccharide à doser sont préparées simultanément avec une gamme étalon composée de solutions d'acide glucuronique à 25, 50 et 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. On ajoute à 200 μL des solutions à doser, 1,2 mL d'une solution de tétraborate de sodium de 0,0125 M préparée dans l'acide sulfurique concentré. Le mélange est homogénéisé puis refroidi dans la glace. Les tubes sont ensuite portés à 100°C au bain-marie durant 5 minutes. Les tubes sont refroidis dans un bain de glace puis on ajoute 20 μL d'une solution de MHDP (*mé*ta-hydroxydiphényle) à 0,15 % dans du NaOH 0,5 %. Les tubes sont homogénéisés au vortex, et une coloration rose apparaît. Les densités optiques sont par la suite mesurées à 520 nm.

II.4.2.3. Dosage du taux de sulfates dans les polysaccharides des microalgues retenues

La détermination du taux de sulfate est effectuée par turbidimétrie selon la méthode de Dogson (**Dodgson et al. 1962**). La gamme étalon réalisée lors de ce dosage nécessite la préparation préalable de solutions de K_2SO_4 de concentration en SO_4^{2-} comprises entre 50 et 1200 $\mu\text{g/mL}$. A 0,2 mL de solution à doser on ajoute 3,8 mL d'une solution d'acide trichloroacétique à 3% (w/v) et 1 mL d'une solution de gélatine- BaCl_2 à 0,5 % (w/w/v). Le précipité de BaSO_4 ainsi formé est stabilisé dans de la gélatine et la turbidité est mesurée à 360 nm par rapport à un blanc approprié.

Pour le dosage des échantillons, 10 mg de polysaccharides lyophilisés sont hydrolysés par 0,5 mL d'une solution de HCl 2M pendant 12 h à 110°C. Sur un échantillon hydrolysé de 0,2 mL on ajoute 3,8 mL d'une solution d'acide trichloroacétique à 3 % (w/v) et 1 mL d'une

solution de gélatine-BaCl₂ à 0,5 % (w/w/v). Le mélange est ensuite homogénéisé au vortex et la turbidité de la solution est mesurée à 360 nm contre un blanc approprié.

II.5. Caractérisation biochimique des plantes

II.5.1. Dosage des chlorophylles et les caroténoïdes

Les chlorophylles a et b sont déterminées selon la méthode de **Arnon (Arnon et al., 1949)**. 0,5g de biomasse sèche de chaque échantillon sont découpées en petits segments (0,5cm) et homogénéisés dans 10ml d'acétone à 80% et conservés à 4°C pendant une nuit. L'extrait organique est centrifugé à 14000rpm/ 5mn et l'absorbance du surnageant est mesurée à 663 et 645 nm pour déterminer la chlorophylle a et la chlorophylle b respectivement. L'équation de **Miazek** a été utilisée pour la détermination des caroténoïdes (**Miazek, 2013**).

$$CH\ a\ (mg/l) = 12,41\ DO\ (663) - 2,59\ DO(645).$$

$$CH\ b\ (mg/l) = 22,9\ DO(645) - 4,68\ DO(663).$$

$$CH\ t = CH\ a + CH\ b$$

CH a: concentration en chlorophylle a.

CH b: concentration en chlorophylle b.

CH t: concentration en chlorophylle totale

$$\text{Carotenoids}_{\text{total}} = (1000 \times A_{470} - 1,63 \times \text{chla} - 104,96 \times \text{chlb}) / 221.$$

II.5.2. Dosage de l'anthocyanine des plantes

Le dosage de l'anthocyanine a été fait selon la méthode de **Ticconi (Ticconi et al. 2001)**. 15mg des feuilles a été broyé avec 2ml de la solution de l'extraction (18% propanol, 1% HCl and 81% H₂O). Le mélange a été incubé 3min à 90°C, puis une centrifugation à 10000rpm a été effectuée avant de mesurer l'absorbance du surnageant à 535 et 650nm.

L'absorbance de l'anthocyanine a été calculée selon la formule suivante : $A = A_{535} - A_{650}$.

II.5.3. Dosage de la proline dans les plantes

Le dosage de la proline est déterminé par une méthode rapide développée par **Singh (Singh et al. 1973)** : 1ml de surnageant, 4ml de solution de ninhydrine, 4ml d'acide acétique glacial et 1ml d'eau distillée sont mis dans des tubes de centrifugation de 10 ml. Ce mélange est chauffé au bain marie (90°C) pendant 45min et refroidi à la température ambiante. L'absorbance est lue à 520 nm.

II.5.4. Dosage des sucres totaux dans les plantes

II.5.4.1. Extraction des solutés organiques

L'échantillon (0.1g de matière fraîche extraite à partir de la feuille développée, la plus jeune) est mis dans un tube à essai et malaxé à l'aide d'une tige avec 1 ml d'éthanol à 95%. Le mélange est mis à chauffer au bain marie (95°C pendant 10 min jusqu'à l'évaporation de l'éthanol).

Le résidu obtenu est solubilisé dans 5 ml d'eau distillée et les tubes sont vigoureusement agités et centrifugés. Le surnageant qui en résulte sert alors à doser les composés organiques solubles.

II.5.4.2. Dosage des sucres totaux

Le dosage des carbohydrates repose sur la condensation des produits de dégradation des sucres. L'acide sulfurique concentré transforme à chaud les glucides en dérivés furfuriques qui donnent avec le phénol une coloration verte (solution diluée) à bleu (solution concentrée) dont l'intensité est mesurée par spectrophotométrie à 492 nm. La détermination de la teneur correspondante est effectuée à l'aide de la courbe d'étalonnage.

✓ Méthodologie

Une solution de phénol à 5% dans de l'eau distillée (5g de phénol dans 100 ml d'eau distillée) a été préparée. 1 ml de réactif au phénol et 1ml d'extrait végétal ou bien de la gamme des sucres solubles totaux sont mis dans un tube à essai. L'ensemble est homogénéisé puis on ajoute –en un seul jet– 5ml d'H₂SO₄ concentré (attention à l'augmentation de la température qui peut atteindre environ 100°C). On agite rapidement au vortex puis on place les tubes au bain-marie à 100°C pendant 5 min, ensuite on laisse reposer pendant 30 min avant de mesurer l'absorbance à 492 nm.

L'équation suivante permet le calcul des sucres solubles en µmol/g MF :

$$\frac{(X) \text{ nmole sucres} \times 10^{-3} \times 5}{0.1 \text{ (g MF)}} = y \text{ } \mu\text{mole sucres/gMF}$$

(X) nmole sucres : lue sur la courbe standard.

(g MF) : l'échantillon des plantes.

II.5.5. Dosage de l'activité enzymatique des ROS-Scavenging enzymes

II.5.5.1. Extraction des protéines à partir des échantillons de feuilles

L'extraction des protéines a été réalisée selon les protocoles standards décrits par **Elavarthi & Martin**. Des quantités de 400mg des feuilles de chaque plante étudiée, sont broyées dans de l'azote liquide et collectées dans un tube de 2ml contenant une solution d'extraction des enzymes : (50 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 contenant 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA et 1 mM sodium ascorbate) (**Elavarthi & Martin, 2010**).

Après centrifugation à 20,000g/20min, le surnageant est collecté et 1,2 ml du tampon d'extraction est ajouté pour une deuxième centrifugation. Les 2 surnageants ainsi collectés sont utilisés pour l'estimation du contenu en protéines.

Les protéines totales sont estimées par la méthode standard de Bradford (1976). 100µl du surnageant est ajouté à 3mL du réactif de Bradford et après 15min, l'absorbance à 595nm est mesurée. La quantité des protéines est estimée à partir d'une courbe standard à base de bovin sérum albumine (BSA).

II.5.5.2. Détermination de la catalase :

L'activité de la catalase CAT est déterminée selon la méthode de (**Dhindsa and Matowe 1981**). Le mélange réactionnel contient 50mM du tampon phosphate de sodium pH 7, 15mM H₂O₂ et 5µg de protéine à partir de l'extrait protéique des feuilles. La décomposition de peroxyde d'oxygène est mesurée à 240nm. L'activité enzymatique de la catalase est exprimée en unité par mg de protéine.

II.5.5.3. Détermination de la Peroxydase :

L'activité de la peroxydase POD est mesurée selon la méthode de **Maehly and Chance (Maehly and Chance, 1954)**. Le mélange réactionnel contient 50mM tampon sodium acétate pH 5,6 ; 5,4mM Guaiacol ; 15mM d'H₂O₂ et 5µg de protéine à partir de l'extrait protéique des feuilles. La réaction de l'oxydation du guaiacol au tetraguaiacol a été dosée à 470nm.

II.5.5.4. Détermination de l'ascorbate Peroxydase :

L'activité de l'ascorbate peroxydase APX est déterminée selon la méthode de **Nakano and Asada (Nakano and Asada, 1981)**. Le mélange contient 50mM tampon du sodium de phosphate pH 7 ; 1mM EDTA ; 0,25mM ascorbate de sodium ; 1mM H₂O₂ et 10 – 30 µg de protéine à partir de l'extrait protéique.

II.5.6. Dosage des composés phénolique totaux

Une quantité de 0,5g de la biomasse fraîche des feuilles de la plante a été homogénéisée avec 1 ml du méthanol (80%) à 4°C. Le surnageant obtenu a été utilisé pour l'analyse de la teneur en phénol après centrifugation de l'homogénat à 20 000 rpm pendant 20 min. La teneur phénolique de l'extrait a été estimée par la méthode de **Taga et al., (1984)**. Pour l'estimation du contenu phénolique, 100µl du surnageant a été mélangé avec 2 ml de Na₂CO₃ à 2% et incubé pendant 2min à température ambiante. Après incubation, on a ajouté 100 µl de réactif phénol de Folin Ciocalteu à 50%, puis la solution réactionnel a été mélangé soigneusement et laissé au repos pendant 30 min à une température ambiante à l'obscurité. L'absorbance de tous les échantillons a été mesurée à 720 nm. Une courbe d'étalonnage a été préparée avec une plage de concentrations de 10 à 200 mg L⁻¹ on utilisant l'acide gallique (sigma, G7384) comme standard. La teneur phénolique a été exprimée en équivalent acide gallique (GAE).

II.6. Etude métabolomique à base de GC-MS de la tomate traitée par les polysaccharides et cultivée dans les conditions du stress salin

Dans cette étude nous avons évalué l'effet de l'extrait des exopolysaccharides de *D. salina* sur le métabolome de la tomate cultivée dans des conditions du stress salin. Cette étude est basée sur une technique de pointe la GC-MS, qui est une analyse des profils métabolomiques permettant l'établissement d'une liste de métabolites caractérisés et quantifiés. L'analyse des empreintes métabolomiques est souvent réalisée dans le but de visualiser rapidement et globalement le plus grand nombre de métabolites constituant une sorte de « signature métabolique » d'un échantillon donné. L'objectif de cette étude est de voir les différentes voies métaboliques de la tolérance de la tomate au stress salin activées par le traitement des exopolysaccharides extraits de la microalgue halophile *D. salina*.

II.6.1. Extraction des métabolites

Les feuilles de la tomate ont été récoltées, congelées dans l'azote liquide et stockées à -80°C jusqu'à l'extraction. Les métabolites ont été extraits des feuilles selon la méthode modifiée de Lisec (**Lisec et al., 2006**). En bref, sur une quantité de 100 mg du tissu broyé, 1460µl de méthanol et 60µl de 0,2 mg/ml de ribitol ont été ajoutés et le mélange a été incubé à 70°C pendant 15 minutes. Les échantillons ont été centrifugés pendant 10 minutes à 12 000 rpm et le surnageant a été transféré dans un nouveau tube, puis 1500µl d'eau et 750µl de chloroforme ont été ajoutés

et l'échantillon a été vortexé et centrifugé pendant 10 min à 4000 rpm. Ensuite, 150 µl de la phase chloroforme a été transféré à un nouveau tube pour l'analyse GC-MS.

II.6.2. Analyse des métabolites

L'analyse par GC-MS a été effectuée après transestérification acide. La réaction a été catalysée par H₂SO₄ à 6% (w: w) dans du méthanol. La réaction a été assistée par ultrasons (Branson Sonifier 450): 40 KHz à température ambiante pendant 1 heure. Le profil métabolique volatil a été caractérisé par chromatographie en phase gazeuse (GC) (Agilent 7890A Series GC) couplée à la spectrométrie de masse (MS) équipée de l'injecteur multimode et de la colonne 123-BD11 d'une dimension de 15m x 320 µm x 0,1 µm et d'ionisation par impact électronique. L'extrait sec a été solubilisé dans du chloroforme et injecté dans la colonne par le mode fractionné 1/2 en utilisant de l'hélium comme gaz porteur à 4 ml / min. La source d'ions et les températures quadruples étaient respectivement de 230°C et 150°C. Le programme de température du four a été démarré à 50°C et maintenu pendant 1 min, puis augmenté par 20°C/minute jusqu'à 320°C avant d'être augmenté jusqu'à 360°C par 3°C/ minute et finalement maintenu constant pendant 10 minutes. La composition des métabolites volatils a été calculée en pourcentage du métabolite total présent dans l'échantillon, déterminé à partir des zones de pic. La détection a été effectuée en utilisant le mode de balayage complet entre 30 et 1000 m/z et avec le facteur de gain 5 et l'identification a été effectuée en utilisant la bibliothèque NIST 2014 MS.



RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre I: Etude physiologique et biochimique de six microalgues Marocaines et de leur potentiel de stimulation de la germination et de la croissance de la tomate.

Introduction

Les microalgues suscitent un intérêt grandissant, en raison de leurs propriétés biologiques telles que l'activité antioxydante, antimicrobienne, anticancéreuse, anti-inflammatoire et cardiovasculaire, anti-obésité et antidiabétique (**Kim et al., 2015**). En effet, les microalgues par leur diversité biochimique font depuis de nombreuses années l'objet de recherches dans un but de valorisation économique de leur biomasse et de diverses molécules à haute valeur ajoutée dans plusieurs applications telles que la nutrition humaine et animale, la chimie, l'énergie ou encore la fabrication de produits cosmétiques, pharmaceutiques et d'agriculture (**Chew et al., 2017**).

Les microalgues représentent une alternative durable potentielle pour l'amélioration et la protection des cultures agricoles (**Garcia-Gonzalez et al., 2016**).

L'objectif de ce chapitre est l'étude de la culture, de la composition chimique et biochimique des microalgues en premier temps et deuxièmement, le criblage de leurs potentiels de stimulation de la germination et de la croissance des plantes de la tomate.

I. Etude de la croissance des souches de microalgues

La croissance et la composition biochimique des microalgues sont influencées par plusieurs facteurs dont les nutriments (**Schmidt et al., 2016**), la température et le pH du milieu (**Juneja et al., 2013**), la lumière (**DeMooij et al., 2017**) et le taux de CO₂ (**Borowitzka 1990; Honda et al., 2017 ; Renaud et al. 1991, 1995; Richmond 1986**). Ces paramètres ont été étudiés pour voir leur effet sur la croissance des microalgues choisis pour cette étude.

L'optimisation des conditions de croissance des 6 souches de microalgues choisis pour notre étude (*Isochrysis sp*, *N. gaditana*, *P. tricornutum*, *D. salina*, *Chlorella sp* et *A. platensis*) a été faite dans des erlenmeyers de 500ml incubés dans des photo-incubateur avec une température et lumière contrôlées. Pour les souches de microalgues retenues du premier criblage sur la stimulation de la germination et la croissance des plantes de la tomate, un photobioréacteur (Sartorius BIostat® PBR) a été utilisé pour la confirmation des conditions de culture optimales.

Les paramètres clés de la culture des microalgues ciblées pour l'optimisation sont le milieu de culture et la température.

I.1. Optimisation du milieu de culture

Les résultats du suivi de la croissance et de la biomasse sèche des souches étudiées dans le projet sont présentés dans la **Figure 13**. Ces résultats ont montré que pour les souches marines *N. gaditana*, *D. salina*, *P. tricornutum*, *Isochrysis sp*, la croissance est similaire dans les deux milieux de culture Walne et f/2, pas de différence significative n'a été signalé. Ce résultat a été aussi confirmé par la mesure de la biomasse sèche accumulée après 10 jours de culture.

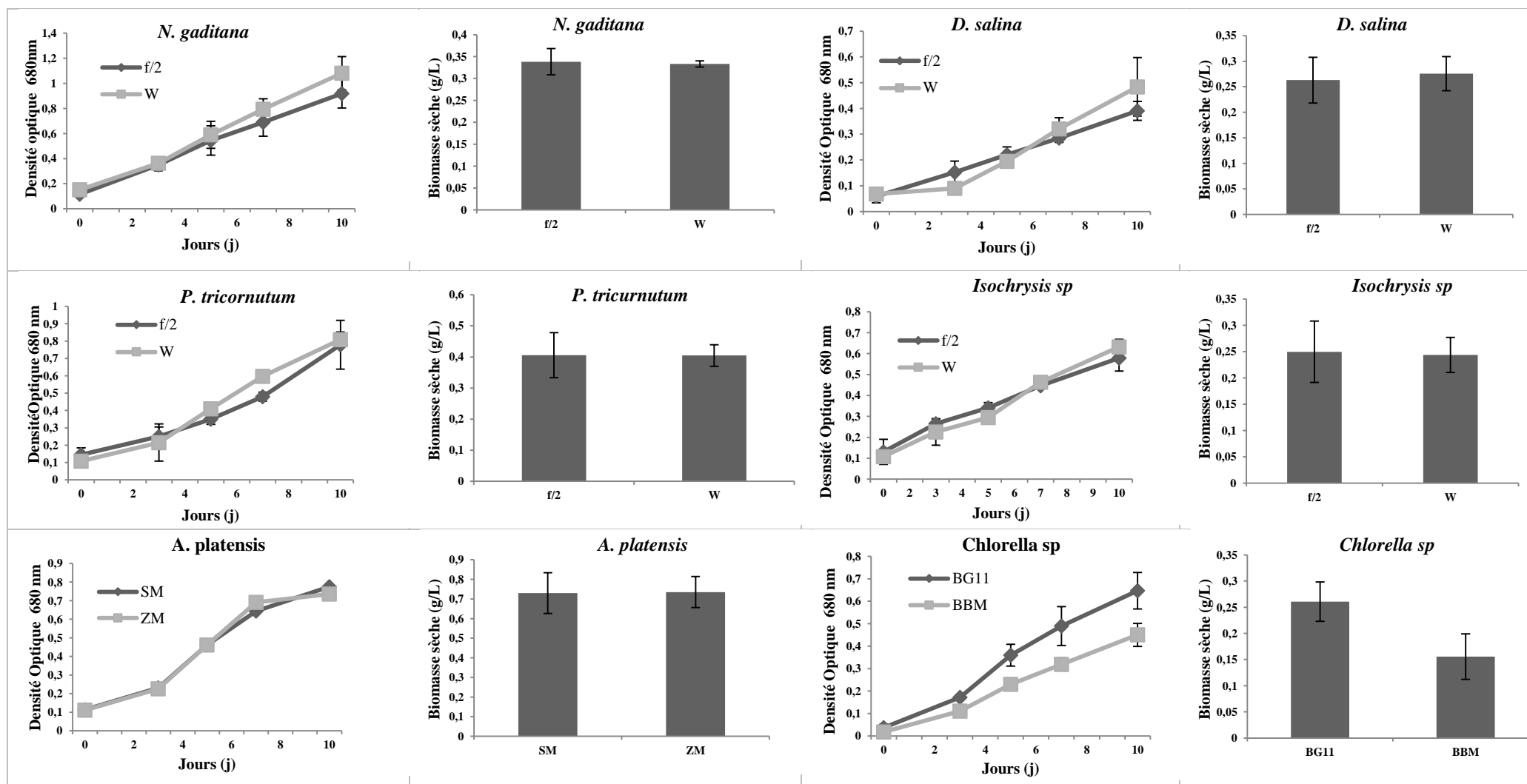


Figure 13: Croissance et production en biomasse des 6 souches de microalgues choisies pour cette étude.

Deux milieux de culture ont été testés pour chaque espèce : Milieu f/2 et milieu Walne (W) pour les 4 souches marines (*N. gaditana*, *D. salina*, *P. tricornutum*, *Isochrysis sp*), le milieu Zarrouk et milieu Spirulina pour la culture de *A. platensis* et le milieu BG11 et BBM pour la culture de *Chlorella sp*.

Des résultats similaires ont été obtenus pour *Chlorella* sp, *Dunaliella* sp, et *Isochrysis* sp. (Lananan *et al.*, 2013). Les milieux de culture n'avaient pas d'influence sur la concentration cellulaire maximale mais une préférence pour un milieu de culture peut être observée entre ces genres.

La souche *N. gaditana* utilisée dans cette étude, a montré la même croissance dans les deux milieux de culture f/2 et Walne, bien qu'il ait été reporté que certaines espèces de ce genre comme *N. oculata* ont une meilleure croissance dans le milieu de Walne (Salavatién *et al.*, 2006). Pour *D. salina*, le milieu le plus utilisé est le milieu de Johnson (Borowitzka 1988). Récemment il a été démontré que le milieu Walne donne une meilleure croissance et un meilleur contenu protéique (Kulshreshtha *et Singh* 2013). En effet, ce milieu a permis une bonne croissance de la souche marocaine utilisée.

Concernant la spiruline (*A. platensis*), bien que le milieu Zarrouk soit le plus utilisé pour sa culture (Chen *et al.*, 2011), les deux milieux testés Zarrouk et milieu *Spirulina* ont montré une bonne croissance sans qu'aucune différence ne soit notée.

Quant à *Chlorella* sp, la croissance dans le milieu BG11 a été meilleure que dans le milieu BBM (une amélioration de 42% pour la croissance et de 73% pour biomasse sèche par rapport au milieu BBM). Des résultats similaires ont été obtenus dans d'autres études (Ilavarasi *et al.*, 2011 ; Elumalai *et al.*, 2014) concluant que le milieu BG11 est le plus approprié pour la culture des espèces de *Chlorella*.

Ayant donné le même résultat que f/2, le milieu de Walne a été choisi pour toutes les souches marines vu sa composition chimique moins compliquée que celle de f/2. Cela permet d'envisager une préparation plus simple des milieux de culture à grande échelle. Pour la spiruline le choix s'est porté sur le milieu Zarrouk qui est le milieu de référence pour la culture de cette espèce et pour *Chlorella* le milieu BG11 a été considéré comme milieu optimal.

I.2. Optimisation des températures de culture avec le milieu optimal

Pour identifier la température de croissance optimale de chaque souche, trois températures ont été testées : 20°C, 25°C et 30°C. Tandis que pour la spiruline, des températures de 25, 30 et 35°C ont été testées en utilisant le milieu de culture ayant donné la meilleure croissance. Les résultats de la biomasse sèche sont présentés dans le tableau 6.

Tableau 5: Biomasse des souches microalgues dans des différentes températures

	Souches microalgues	Température		
		20°C	25°C	30°C
Biomasse (g/L)	<i>N. gaditana</i>	0.35±03	0.37±009	0.28±03
	<i>D. salina</i>	0.26±02	0.28±01	0.25±01
	<i>P. tricurnutum</i>	0.42±05	0.39±04	0.31±06
	<i>Isochrysis sp</i>	0.21±01	0.24±05	0.25±04
	<i>Chlorella sp</i>	0.07±006	0.26±02	0.09±003
			25°C	30°C
	<i>A. platensis</i>	0.51±03	0.71±06	0.73±07

Les meilleures productions de biomasses pour les souches marines ont été obtenues dans une température entre 20 et 25°C. Par contre, la spiruline a montré une meilleure production de la biomasse dans la température de 35°C. Tandis que la température optimale de croissance de l'espèce d'eau douce *Chlorella sp* était de 25°C.

Il est bien connu dans la littérature que la température est l'un des facteurs qui influencent la croissance des microalgues en culture photosynthétiques (**Renaud et al., 1995; Sigaud and Aidar 1993 ; Choi et al., 2012**). Cependant cet effet est très lié à l'espèce elle-même. Pour les espèces étudiées, la croissance de *N. gaditana*, *D. salina*, *Isochrysis sp.*, ne semble pas être influencée par la température vue l'absence de différence significative des résultats de la production de la biomasse à 20, 25 et 30°C. En revanche, *Nannochloropsis sp* a montré une bonne croissance entre 14 à 30°C (**Hu et Gao 2006**) et certaines espèces de ce genre préfèrent des températures entre 25°C et 30°C (**Chen et al., 2012 ; Widiamingsih et al., 2013**). Par contre, certaines espèces de Chlorelle préfèrent des températures plus faibles comprises entre 20 et 25°C (**Hirata et al., 1981 ; Seto et al., 1984**).

D. salina est connue par sa tolérance à un large intervalle de températures (**Gomez and Gonzalez 2005**). Elle a une bonne croissance à 30°C (**Widiamingsih et al., 2013**), mais certaines souches préfèrent des températures inférieures à 25°C. Des résultats similaires ont été obtenus sur *Isocrysis sp.* (**Renaud et al., 1995**) bien que certaines études avaient montré une bonne croissance à des températures comprises entre 19°C et 32°C avec un optimum à 27°C. Au-delà de cet intervalle la croissance diminue (**Chen et al., 2012**).

Pour *P. tricornutum*, une meilleure croissance est obtenue à 20 et 25°C. Cependant elle ralentie à 30°C. Cette microalgue est connue pour son intolérance aux températures élevées, une bonne croissance est obtenue entre 16 et 26°C (Sigaud and Aidar 1993; Kvéderová et Lukavský 2003). Ces résultats ont été retrouvés pour la souche marocaine dont la croissance a été réprimée à 30°C.

En ce qui concerne la spiruline, une meilleure croissance est notée à 35°C. Cette microalgue a aussi une bonne croissance entre 25 et 30°C et ne commence à ralentir sa croissance qu'à 20°C. Cette microalgue est connue pour avoir un taux de croissance et une productivité élevés entre 30°C et 35°C (Trabelsi et al., 2009). Torzillo et Vonshak (1994) ont confirmé que 35°C est la température optimale pour la photosynthèse de cette souche. Dans l'étude de Kumar et collaborateurs (Kumar & collaborateurs, 2011), la cinétique de croissance a montré une tolérance à une large gamme de température de 20 à 40°C avec un optimum de 35°C ce qui s'est confirmé pour la souche marocaine testée.

II. Criblage des souches de microalgues pour la stimulation de la germination et de la croissance de la tomate

II.1. Effet des extraits bruts de la biomasse hydrolysée des microalgues sur la germination et la croissance de la tomate

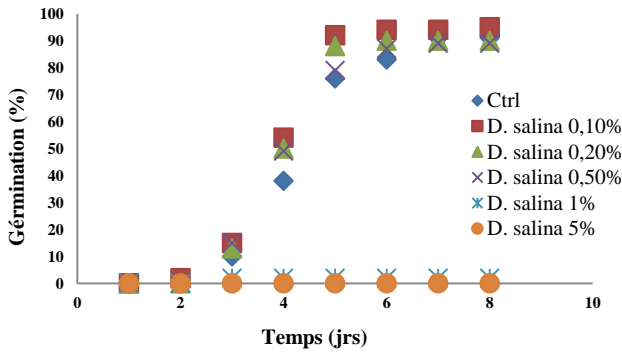
Dans ce projet, nous avons fait un premier criblage des souches de microalgues sur la stimulation de la germination et la croissance des plantules de la tomate avant de passer à l'étude approfondie des microalgues ayant montré la meilleure activité de stimulation des plantes.

Six souches de microalgues marines choisies pour cette étude, dont 4 espèces (*Isochrysis sp*, *N. gaditana*, *D. salina*, *P. tricornutum*), une espèce d'eau douce (*Chlorella sp*) et une cyanophycée (la spiruline), ont été cultivées dans des conditions optimales pour la production de la biomasse nécessaire pour le premier criblage sur la stimulation de la germination et la croissance de la tomate.

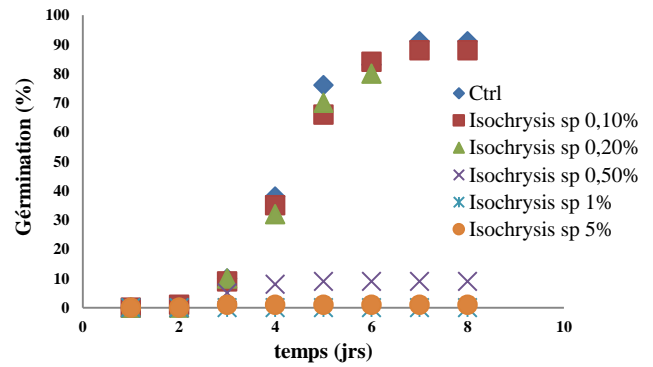
Dans ce criblage nous avons utilisé l'extrait global de la biomasse des microalgues après l'hydrolyse acide, trois concentrations par extrait ont été testées sur la germination et la croissance de la tomate.

Le résultat présenté dans la **figure 14**, a montré que seulement deux souches à savoir : *D. salina* et *A. platensis* parmi les 6 souches utilisées, ont montré un potentiel de stimulation de la

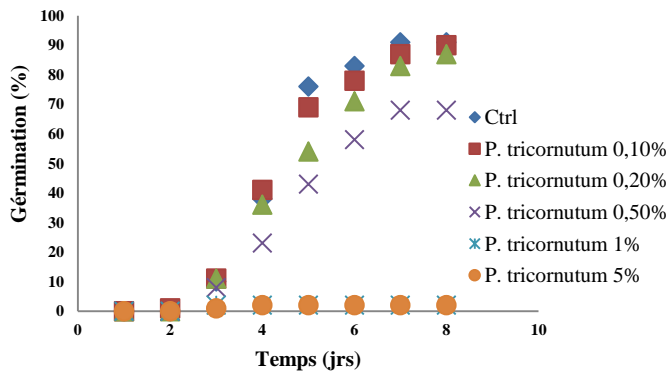
germination des graines de la tomate. L'hydrolysate de *D. salina* à 0,1% a permis l'accélération de la vitesse de germination des graines de la tomate, dont le pourcentage maximal de la germination des graines a été obtenu au 5^{ème} jour (94% des graines germées), alors que le pourcentage des graines non traitées ne dépasse pas 83%. Un résultat similaire a été obtenu pour les graines traitées par 0.2% de l'extrait d'*A.platensis*, 97% des graines ont germées dans le 5^{ème} jour par rapport au contrôle (83%).



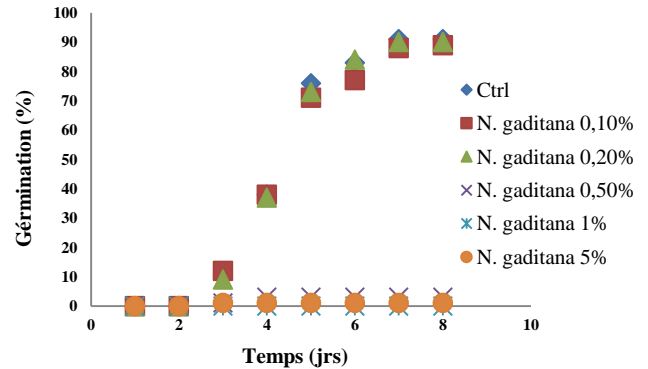
D. salina



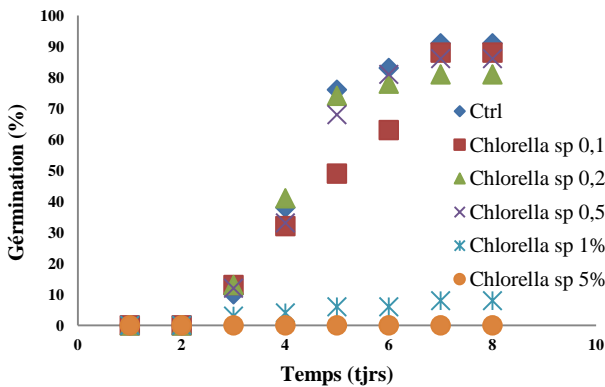
Isochrysis sp



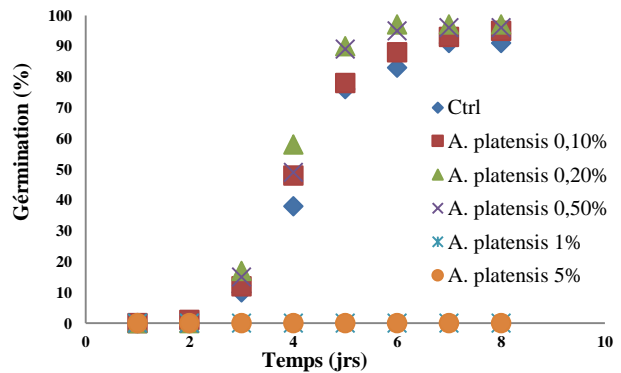
P. tricornutum



N. gaditana



Chlorella sp



A. platensis

Figure 14: Effet des hydrolysats de la biomasse de différentes souches de microalgues sur la vitesse de la germination des graines de la tomate.

Les extraits sont testés à différentes concentrations dans des boîtes de pétri pendant 8 jours à 25°C dans des conditions d'obscurité.

Le **figure 15** a montré que les mêmes souches (*D. salina* et *A. platensis*) ont un effet positif sur la croissance des plantules de la tomate. Les plantules sont traitées par les extraits des microalgues trois fois (1 fois par semaine). L'hydrolysat de *D. salina* à 0,1% a montré un effet de stimulation de la croissance de la tomate avec un pourcentage de 25,3% pour la partie aérienne et 39,7% de la partie racinaire par rapport au contrôle non traité, alors que l'extrait de

A. platensis à 0.2% a amélioré la croissance de la tomate avec 33,7% pour la partie aérienne et 47,6% pour la partie racinaire par rapport au contrôle.

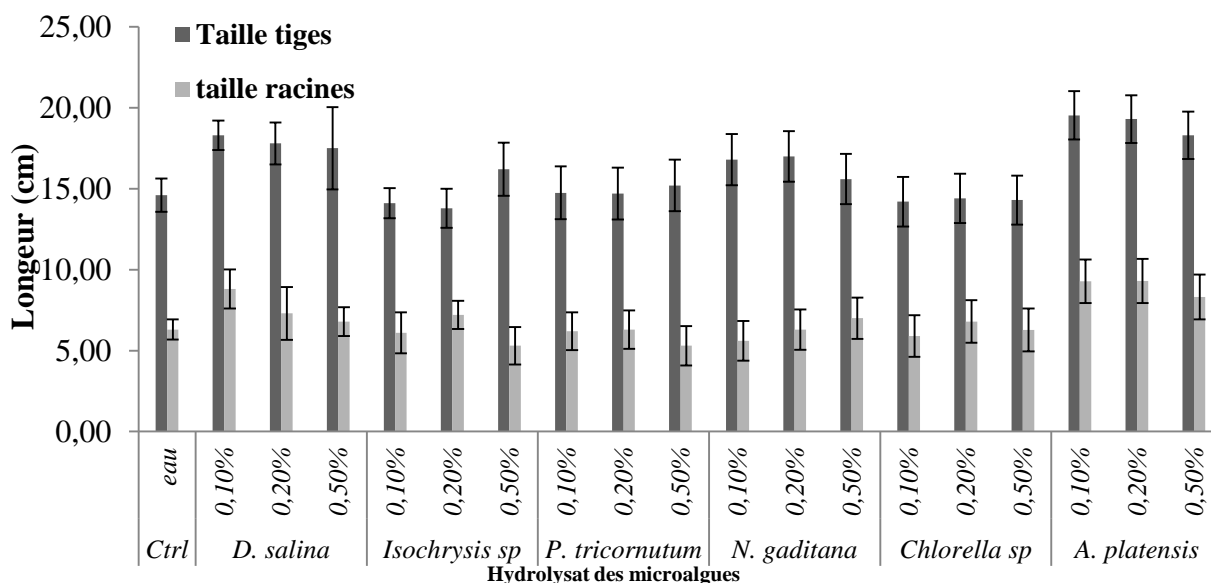


Figure 15: Effet des hydrolysats de la biomasse de différentes souches de microalgues à différentes concentrations sur la taille des plantes de la tomate.

Les plantes sont cultivées dans un mélange sol/tourbe (80/20%) dans le phytotron pendant 30 jours à 25°C dans des conditions de photopériode de 16/8 et une humidité de 68%.

Les microalgues sont une source prometteuse pour le développement des biostimulants des plantes (Garcia-Senin, S. 2013). L'étude de Michalak et al., 2016 a montré que l'extrait de *A. platensis* à 10% a permis la stimulation de la croissance des plantes du blé avec 18,5% par rapport au contrôle non traité. Une autre étude a montré que la biomasse de la *Spirulina sp* peut être une source de production des biomolécules actives d'intérêt commercial (Michalak et al., 2017). L'étude de Aghofack-Nguemezi et al., 2017 a montré que l'extrait brut de *A. platensis* a stimulé significativement la croissance de la tomate avec 28.18% et 48.29% de la longueur et le poids de la partie aérienne respectivement. Michalak et al., 2015 ont indiqué que la microalgue halophile *D. salina* est très riche en molécules bioactives qui peuvent stimuler les différentes voies des plantes telles que la croissance et le développement des plantes. Ces études ont montré le potentiel de ces souches de microalgues pour la stimulation des plantes. L'étude de la caractérisation biochimique de ces microalgues pourra détecter les molécules bioactives de ces microorganismes qui ont déclenchés effets de stimulation de différentes voies dans les plantes.

II.2. Effet des différents extraits de microalgues retenues sur la germination et la croissance des plantules de la tomate

Après le criblage des souches de microalgues sur la germination et la croissance de la tomate, nous avons étudié les différents types d'extraits qui ont donné l'activité de stimulation, 4 fractions ont été étudiées sur la germination et la croissance de la tomate : extrait aqueux (EA), extrait Ethanolique (EE), extrait dichlorométhanique (EDM), Hydrolyse acide de la biomasse totale (HA) et l'hydrolysats des résidus de la biomasse après extraction aqueuse (HR).

La **figure 16** montre que les fractions des deux souches de microalgues utilisées dans cette étude qui ont donné l'effet le plus important de stimulation de la germination et la croissance de la tomate, sont les fractions HA et EA. Les extraits HA et EA ont stimulé la germination des graines de la tomate avec 14,8 et 19,7% pour *D. salina* et 18,5 et 20,9% pour *A. platensis*.

La taille des plantules de la tomate a été stimulée avec les mêmes fractions que la germination, la partie aérienne a été améliorée de 44,4 et 60,9% pour les fractions HA et EA de *D. salina* et 39,1 et 75,2% pour *A. platensis*, Alors quela taille de la partie racinaire a été stimulée par 50,8 et 65,9% pour *D. salina* et 22,9 et 62,3% pour *A. platensis* par rapport au contrôle.

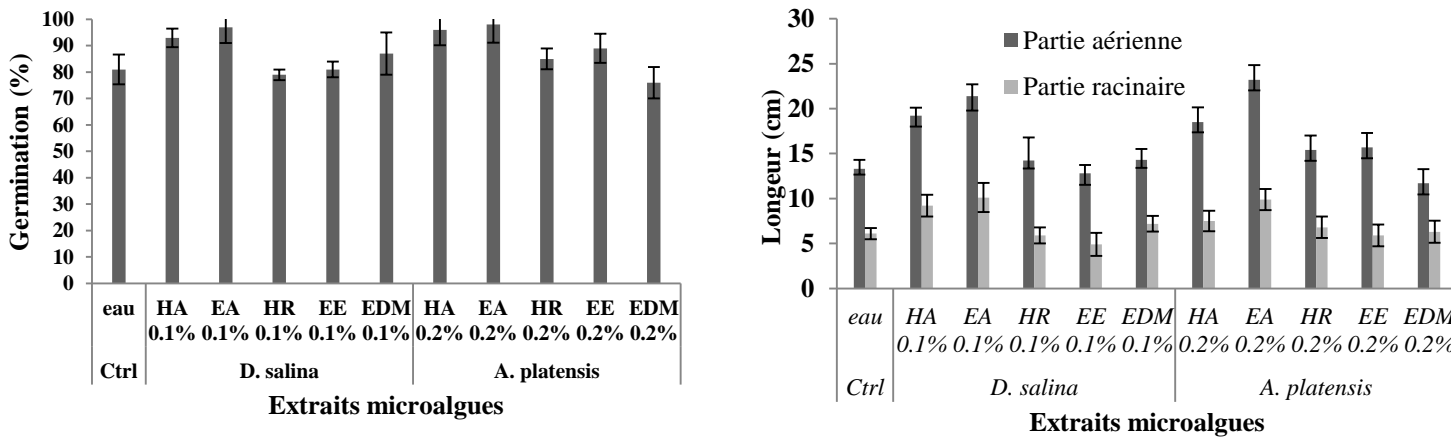


Figure 16 : Effet des différentes fractions de la biomasse des deux souches microalgues (*D.salina*, *A. platensis*) sur la germination et la croissance de la tomate.

(HA: hydrolyse acide de la biomasse ;EA: Extrait aqueux; HR: Hydrolyse des résidus de la biomasse après extraction aqueuse; EE: extrait éthanolique; EDM: Extrait dichlorométhanique). Les graines de la tomate germées dans des boîtes de pétri pendant 8 jours à 25°C dans des conditions d'obscurité. Eiles plantes de la tomate sont cultivées dans un mélange sol/tourbe (80/20%) dans phytotron pendant 30 jours à 25°C dans des conditions de photopériode de 16/8 et une humidité de 68%.

III. Etude des microalgues retenues

Dans cette étape du projet nous avons approfondi l'étude sur les deux souches retenues du premier criblage sur la germination et la croissance des plantules de la tomate, la spiruline (*A. platensis*) qui est une algue bleu-vert extrémophile, qui croit dans des pH très basique (jusqu'à 12). L'importance de cette souche est liée à plusieurs paramètres tels que le profil biochimique, l'activité biologique, ainsi que leur caractère extrémophile. La deuxième souche de cette étude est une chlorophycée halophile (*D. salina*) qui tolère des degrés élevés de salinité, à part leur potentiel de stimulation de la germination et la croissance de la tomate, cette souche a été choisie pour deux autres objectifs, premièrement comme une espèce modèle pour comprendre le mécanisme morphologique et biochimique de la tolérance au stress salin. Le deuxième objectif, est l'exploitation du potentiel biochimique de la tolérance de cette souche au stress salin pour développer des produits qui pourront stimuler le processus d'atténuation de l'effet du stress salin sur la germination et la croissance des plantes.

III.1. Amélioration du rendement des souches retenues par l'injection du gaz carbonique (CO₂)

Après la caractérisation de la biomasse et les extraits actifs des souches de microalgues, nous avons étudié la possibilité de l'amélioration de la productivité de biomasse de ces souches par l'injection du gaz carbonique dans la culture.

Dans cet objectif, trois concentrations de CO₂ à tester sont 0%, 1% et 3% en utilisant pour chaque souche le milieu de culture et température de croissance déjà optimisés.

Le résultat présenté dans la **figure 17** a montré une amélioration de la croissance et la production en biomasse de *D. salina* avec 50 et 71% en présence de 1 et 3% de CO₂ respectivement par rapport au contrôle. Certaines études ont montré l'effet positif du CO₂ sur la croissance et la biomasse de *D. salina* tolèrent des concentrations jusqu'à 50% de CO₂ (Tawfiq et al., 2010 ; Ying 2014).

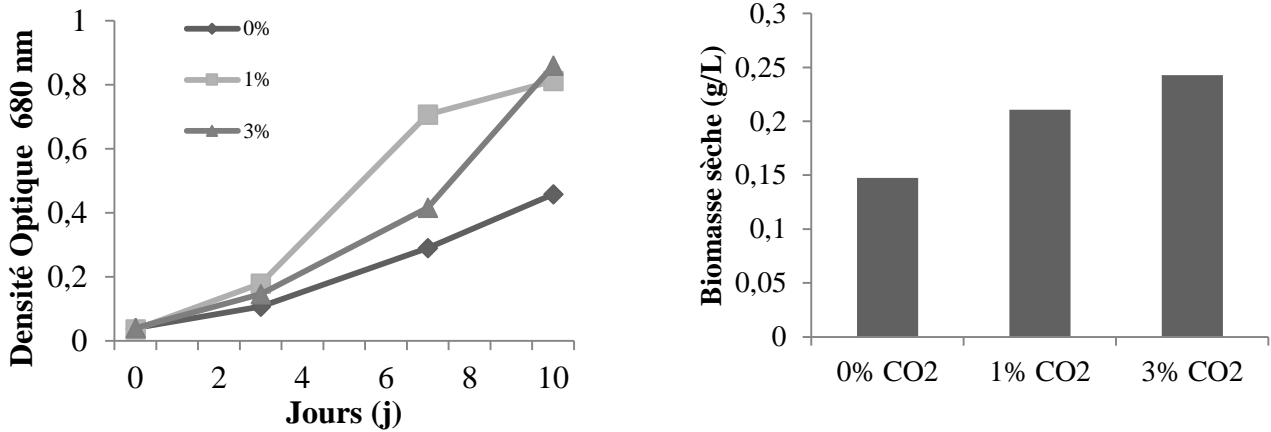


Figure 17 : Effet de CO₂ sur la croissance et la production de la biomasse de *D.salina*.

D. salina cultivée dans le milieu Walne pendant 14 jours à une température de 25°C, avec une luminosité continue de 5000lux.

Dans ces conditions la spiruline (*A. platensis*) a montré une nette amélioration (33%) de la croissance en présence de 3% de CO₂ (Figure 18) tandis que 1% de CO₂ n'a pas eu d'effet significatif sur la croissance de cette souche. L'effet positif de l'addition du CO₂ dans le milieu de culture a été préalablement noté dans d'autres études (Kumar et al., 2011 ; Zheng et al., 2012 ; Kim et al., 2013). Cette amélioration de la biomasse est aussi accompagnée par une augmentation de l'accumulation de bioproduits comme les lipides et les protéines (Chen et al., 2013 ; Kim et al., 2013).

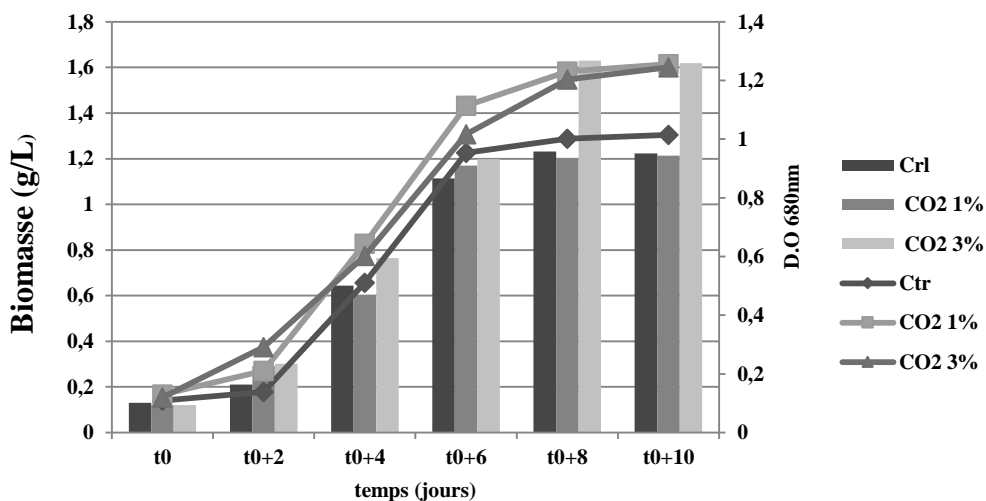


Figure 18 : Effet de CO₂ sur la croissance et la production de la biomasse de la spiruline.

La culture a été faite dans un photobioréacteur avec trois pourcentages du CO₂, les autres paramètres ont été fixés: pH 10, Température 30°C et lumière de 5000lux.

Les microalgues incluses dans ce projet sont photosynthétiques utilisant le CO₂ atmosphérique comme source de carbone pour leur croissance et leur multiplication. L'effet du CO₂ sur la croissance des microalgues photosynthétiques varie selon la tolérance de la souche et la source de carbone préférée ; le CO₂ inorganique ou les bicarbonates (Fillali, 2012). Plusieurs microalgues tolèrent de fortes concentrations de CO₂ traduisant cela par une augmentation de leur croissance et de l'accumulation de biomolécules dans la cellule (Sheng-yi et al, 2008). D'autres espèces bien qu'elles utilisent le CO₂ atmosphérique tolèrent juste des faibles concentrations et tout dépassement des seuils limites se traduit par un ralentissement voir une inhibition de la croissance.

III.2. Caractérisation de la biomasse des souches retenues

Les microalgues sont connues par leur richesse en protéines, lipides, acides aminés et polysaccharides/oligosaccharides, leur conférant une forte valeur ajoutée. La concentration en protéines/acides aminés, en lipides et en minéraux est fortement liée à l'espèce et aux conditions de culture. Le profil biochimique des biomasses est étudié en considérant les lipides totaux, les protéines totales, les sucres et leur contenu en NPK.

Le résultat de la caractérisation a montré un potentiel biochimique très important des deux souches étudiées, qui peuvent être valorisées pour le développement des produits pour l'agriculture (tableau 7)

Tableau 6: Caractérisation de la biomasse des souches microalgues retenues

	Lipides (%)	Protéines (%)	Sucres (%)	NPK (%)
<i>A. platensis</i>	10,5	58,5	15	8,5/0,8/2.24
<i>D. salina</i>	11,9	29,6	12	5,83/0,9/0,74

La spiruline (*A. platensis*) est par excellence la source algale de protéines avec un taux de protéines de 40-71% (Becker, 2007, Shabana et al., 2017). Les protéines constituent une source importante d'azote étant le premier élément majeur nécessaire pour la croissance des plantes. Dans certains cas les plantes sont capables d'assimiler les protéines directement, ou sous forme d'acides aminés libérés par l'action de protéases (Yamagata et Noriharu 1999; Näsholm et al. 2000).

L'analyse du profil lipidique par la chromatographie gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (GC-MS) a montré que les deux souches sont riches en acides gras de longue chaîne, *D.*

salina est constitué de 5, 9, 15, 25 et, 41% de C18:2, C22:3, C16:4, C18:0 et C18:3 respectivement, alors que *A. platensis* est constitué de 1.62, 8.2, 16, 18.2 et 25,2% de C20:3, C16:1, C18:3, C18:2 respectivement (**figure 19**)

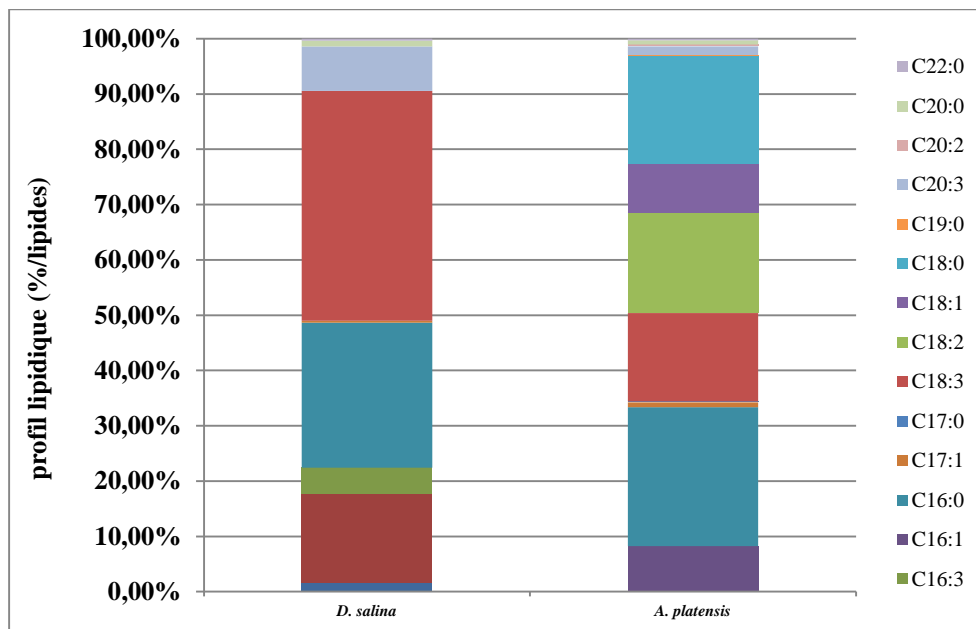


Figure 19: profil lipidique des deux souches microalgues : *A. platensis* et *D.salina*.

A. platensis a été cultivée dans le milieu Zarrouk à 35°C avec une luminosité de 5000Lux et pH 10 pendant 10 jours, et *D. salina* cultivée dans le milieu de walne à 25°C avec une luminosité de 5000lux et pH 7.2 pendant 10 jours.

Les acides gras à très longues chaînes (AGTLCs) sont utilisés dans la biosynthèse de nombreux lipides présents sous forme de réserves dans la graine. Ils entrent aussi dans la constitution des membranes biologiques sous forme de phospholipides ou de sphingolipides. Les AGTLCs sont essentiels au développement et à la croissance de la plante et nécessaires à la division et à la polarité cellulaire, deux processus fondamentaux du développement. Ils permettent à la cellule de se positionner dans le tissu et contribuent à la croissance orientée des organes (**Bach et al., 2011, Markham et al., 2011**). Pour cela le taux de lipides et le profil lipidique des deux souches ont été analysés.

III.3. Caractérisation des extraits actifs des deux souches microalgues sélectionnées

Après le criblage des différents types d'extraits des deux souches sur la germination et la croissance des plantules de la tomate, l'extrait aqueux est la fraction qui a donné plus de l'activité de stimulation de la germination et la croissance des plantules de la tomate. Pour cette raison nous avons caractérisé la fraction aqueuse des deux souches microalgues.

Le résultat de l'analyse de ces deux extraits a montré que les polysaccharides sont les constituants majoritaires de ces extraits. Après la purification et la confirmation de l'activité des polysaccharides extraits de ces deux microalgues sur la germination et la croissance des plantules de la tomate nous avons travaillé sur l'optimisation de l'extraction des polysaccharides totaux des microalgues, ainsi que la caractérisation de ces polysaccharides.

III.3.1. Extraction des polysaccharides des microalgues

Dans cette étude nous avons essayé d'optimiser la méthode d'extraction des polysaccharides totaux à partir des microalgues dans leurs milieux de culture, nous avons optimisé le temps de l'extraction à 90°C. La **figure 20** a montré que 4 heures d'incubation à 90°C a donné le maximum des polysaccharides, alors que la méthode d'extraction assistée par l'autoclave a montré un rendement d'extraction meilleur en un temps minime (30min) par rapport à la première méthode. Après la précipitation et la purification des polysaccharides, le contenu de la spiruline en polysaccharides est de 7% par rapport à la biomasse sèche. Alors que *D. salina* contient 5% des polysaccharides.

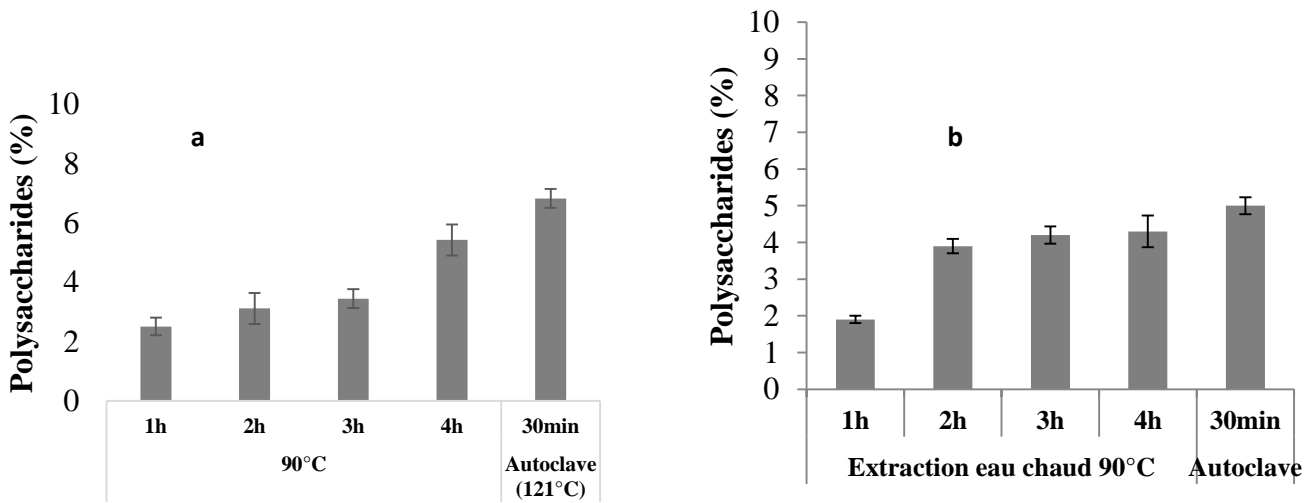


Figure 20: Polysaccharides extraits à partir de *A. platensis* et *D. salina* par différentes méthodes. Optimisation de l'extraction des exopolysaccharides à partir de la culture des deux souches (a: *A. platensis* et b: *D. salina*): l'optimisation du temps d'extraction à 90°C sous une agitation de 400rpm pendant 1h, 2h, 3h et 4h. Et pour la deuxième méthode d'extraction assistée par l'autoclave à 121°C pendant 30min.

III.3.2. Caractérisation des polysaccharides extraits des microalgues

Après l'optimisation de l'extraction des polysaccharides et la confirmation de leurs activités sur la stimulation de la germination et la croissance des plantules de la tomate, nous avons effectué des analyses de caractérisation de ces biopolymères microalgaux.

Les dosages colorimétriques des sucres totaux et des acides uroniques nous renseignent sur la part des acides uroniques dans le polymère. Les résultats obtenus (**tableau 8**) montrent que le polysaccharide extrait d'*A. platensis* est composé de 12.8 % (w/w) d'acides uroniques et de 58,7% (M/M) d'oses neutres, tandis que *D. salina* est composée de 8.3 % (M/M) d'acides uroniques et 46,9 % (M/M) d'oses neutres.

Le dosage du taux de sulfate a été réalisé selon la méthode de turbidimétrie de **Dodgson et Price (1962)**. Le taux du sulfate est de 4.8% dans les polysaccharides de *A.platensis*, alors que *D. salina* contient 2.8% de sulfate.

Tableau 7: Composition des exopolysaccharides extraits des microalgues

<i>Microalgues</i>	Composition des polysaccharides		
	Sucres neutres	Acides uroniques	Sulfate
<i>A. platensis</i>	58.7%	12.7%	4.8%
<i>D. salina</i>	46,9 %	8.3 %	2.8

L'étude de **Mishra et al., 2011** a montré que les polysaccharides extraits de *D. salina* contient 2.7% de sulfate, ainsi que l'analyse HPLC a montré qu'ils sont constitués de glucose, galactose, fructose et xylose, alors que l'analyse RMN a montré la présence des groupements amine alkyle ou cyclique. Cette étude a montré aussi, que les polysaccharides extraits de *D. salina* sont thermostables. Les polysaccharides de la spiruline sont composés de glucose, Rhamnose, mannose, xylose et galactose, et contiennent de 2.3% du sulfate, et 9.5% de l'acide uronique (**Shekharam et al., 1987**). Plusieurs études ont montré que les acides uroniques et les polysaccharides riches en ces acides en plus du groupements sulfate ont des activités biologiques très importantes, telles que l'étude de **Hayashi et al., 1996** qui a montré que les exopolysaccharides sulfatés extraits de *A. Platensis* ont une activité anti-herpès et anti-VIH sur des tests *in vitro*. Dans le même sens, **Mishima et al., 1998** a montré que les polysaccharides sulfatés de cette algue bleu-vert (*A. platensis*) ont une activité anticancéreuse. Dans le domaine de l'agriculture, plusieurs études ont montré que les polysaccharides extraits de macro ou microalgues ont un potentiel de stimulation de la germination, de la croissance, de la tolérance des plantes aux stress abiotiques et de la défense contre les agressions des phytopathogènes (**Khan et al., 2009; Nerissa et al., 2015; Chernane et al., 2015; Aly et al., 2002**).

IV. Conclusion

Dans ce chapitre nous avons commencé par l'optimisation des conditions de la culture de 6 souches de microalgues (4 marines, une chlorophycée d'eau douce, et une cyanophycée) choisis pour ce projet. Nous avons ciblé les paramètres clés de la culture des microalgues tels que le milieu de culture et la température. Une comparaison entre les deux meilleurs milieux les plus utilisés pour la culture de chaque souche a montré que la culture des 4 souches marines dans les deux milieux choisis (f/2 et Walne) n'a pas montré de différences significatives dans la croissance de ces souches. Pour des raisons économiques nous avons choisi le milieu Walne comme milieu à faible coût de culture des souches marines pour la suite des expériences. Alors que pour la culture de *A.platenisis*, la comparaison entre le milieu Zarrouk et milieu « *Spirulina* medium » a montré que les deux milieux ont le même effet sur la croissance de cette souche, ainsi nous avons opté pour le milieu zarrouk puisqu'il est le plus utilisé dans la culture industrielle de cette souche. Contrairement aux autres souches étudiées, *Chlorella* sp a donné une meilleure croissance dans le milieu BG11 par rapport au milieu BBM, et donc il a été choisi pour la suite des expériences comme milieu adéquat pour la culture de cette souche.

Après le choix des milieux optimaux, nous avons étudié l'effet de trois températures sur la croissance des microalgues de cette étude pour déterminer la température optimale de chaque souche. Cette étude a montré que toutes les souches marines (*Isochrysis* sp, *P.tricornutum*, *D. salina* et *Tetraselmis* sp) étudiées ont montré une bonne croissance dans une température de 25°C, alors que les températures optimales pour la croissance pour *A.platenisis* et *Chlorella* sp sont de 35°C et 25°C respectivement. Les conditions de culture des microalgues sont des facteurs déterminants de la composition chimique et biochimique de ces microorganismes, la détermination des conditions optimales de la culture des microalgues est très importante pour une culture biochimiquement stable. Les extraits de l'hydrolyse acide des biomasses algales cultivées dans les conditions optimales ont été la base d'un criblage sur la stimulation de la germination et la croissance de la tomate.

Le criblage du potentiel de ces microalgues à stimuler la germination et la croissance de la tomate a montré que deux souches (*A.platenisis* et *D. salina*) parmi les 6 souches étudiées, ont un effet de stimulation de la vitesse de la germination et de la croissance des plantules de la tomate. Les deux souches de microalgues actives sont des extrémophiles, *A.platenisis* est une cyanophycée qui vit à un pH de 12. *D. salina* est une microalgue marine halophile qui tolère des concentrations élevées de salinité. Cette particularité d'extrémophilie de ces deux souches

ouvre l'hypothèse sur la spécificité biochimique de ces microalgues, ainsi que l'importance de l'étude de caractérisation et de valorisation de ces souches pour des éventuelles applications industrielles. D'ailleurs, *D. salina* a une particularité biochimique liée avec les conditions de culture, dans les conditions de stress salin cette souche a subi tout un changement biochimique pour tolérer ces conditions extrêmes de salinité, par exemple, elle accumule des caroténoïdes, la proline, accumulation des lipides polyinsaturés, ainsi qu'une libération d'une bonne quantité des exopolysaccharides dans le milieu de culture pour la régulation de la pression osmotique de cette halophile microalgue. Dans ce sens, *A. platensis* est une autre microalgue extremophile qui peut tolérer un pH jusqu'à 12 ce qui donne une spécificité biochimique de cette microalgue bleu-verte. Cette cyanophycée est connue par sa production de la phycocanine, un taux de protéine qui peut atteindre jusqu'à 70%, ainsi qu'une libération des exopolysaccharides bioactives tels que le calcium et le sodium-spirulan, ainsi que des acides gras polyinsaturés et des acides aminés libres. L'activité des molécules produites par ces microalgues, est largement décrite dans tous les domaines tels que l'activité antibactérienne, antivirale, antifongique, antioxydante. Dans le domaine de l'agriculture, ces molécules pourront activer les différentes voies métaboliques liées à la croissance, le développement et la tolérance des plantes. Les polysaccharides d'origine algale par exemple sont largement décrits comme éliciteurs de la défense naturelle des plantes contre les agressions biologiques, stimulateurs de la croissance, ainsi ils pourront activer les mécanismes de tolérances contre les stress environnementaux tel que le stress salin.

Avant la caractérisation biochimique et chimique, une amélioration de la croissance de ces deux souches a été faite par l'addition du CO₂ avec différents pourcentages dans la culture pour pousser l'activité photosynthétique de ces deux souches, le résultat de cette expérience a montré que 3% du CO₂ est le pourcentage qui a donné une meilleure croissance pour les deux souches. La caractérisation chimique et biochimique a montré que ces deux souches sont riches en protéines, lipides (avec des acides gras de longue chaîne qui rentrent dans la biosynthèse de nombreux lipides présents sous forme de réserves dans la graine et dans la constitution des membranes biologiques sous forme de phospholipides ou de sphingolipides). Ainsi elles sont riches en polysaccharides et en éléments chimiques NPK, ce qui ouvre la possibilité de la valorisation de cette biomasse pour le développement des produits d'agriculture tels que les biofertilisants et/ou les biostimulants. Cette caractérisation a montré aussi que ces deux souches sont très riches en exopolysaccharides sulfatés que plusieurs études ont déjà décrits comme molécules biologiquement actives. Après la validation de l'effet de ces exopolysaccharides sur

la stimulation de la germination et la croissance de la tomate, une caractérisation de ces exopolysaccharides a montré que ces molécules sont constituées de sucres simples à côté d'un bon pourcentage d'acides uroniques et un taux de sulfate très important, connus pour leurs activités biologiques. Cette richesse chimique et biochimique de ces souches pourra donner toutes les possibilités de développement des produits actifs pour la stimulation des différentes voies métaboliques des plantes, et la contribution dans l'élargissement du spectre des produits biologiques dans le but de privilégier l'agriculture durable.

Chapitre II: Etude de l'effet des polysaccharides extrait de la microalgue *Spirulina platensis* sur la germination et la croissance des trois plantes étudiées.

Introduction

L'agriculture moderne est souvent limitée par diverses contraintes environnementales (biotiques et abiotiques) qui affectent le rendement des cultures. La résistance endogène des plantes ou la tolérance au stress biotique et abiotique peuvent être efficacement renforcées par certains produits actifs naturels, qui sont classés comme biostimulants. Pour la première fois, les activateurs dérivés biologiquement ont été définis sous le nom général de «biostimulants» en 1997 par Zhang et Schmidt, qui favorisent la croissance des plantes. Les polysaccharides marins sont des composés biologiques importants qui existent largement dans les organismes marins (Wang et al., 2012).

L'objectif de cette partie du travail est l'étude du potentiel des polysaccharides extraits de la microalgue *A. platensis* à stimuler la germination et la croissance des plantes.

I. Effet des polysaccharides extraits de la spiruline sur la germination des graines et la croissance des plantes

I.1. Effet sur la germination des graines

La germination est une phase physiologique qui correspond à la transition entre la phase de vie latente de la graine sèche et la phase de développement de la plantule. Le processus de germination commence dès que la graine sèche est hydratée. Plusieurs facteurs externes et internes de la graine peuvent inhiber ou retarder la germination ce qui influence négativement la croissance et la productivité des plantes. Plusieurs solutions ont été envisagées pour l'accélération de la vitesse et le pourcentage de la germination des graines. Pour cet objectif nous avons étudié le potentiel des polysaccharides extraits des microalgues à stimuler la germination des graines et la croissance de trois plantes choisies pour cette étude (Tomate, blé et poivron).

Les résultats présentés dans la **figure 21** ont montré que les polysaccharides extrait d'*A. platensis* (0,05g/L) ont accéléré la vitesse et le pourcentage de la germination des graines. Ces résultats ont montrés que le traitement par les polysaccharides a stimulé la germination des

graines de la tomate pour les trois concentrations étudiées, surtout pour la concentration 0,05g et 0,1g/L (**fig. 21 a**) qui ont donné le maximum d'amélioration. Après la détermination de la concentration efficace, nous avons choisi la concentration 0,05g/L comme traitement des graines du blé et du poivron pour la suite de l'étude.

Ce traitement a permis la stimulation de la vitesse de germination des graines du blé (**Fig 21 b**), avec un maximum des graines germées est obtenu au 3^{ème} jour. Alors que chez les graines non traitées (témoin) le maximum des graines germées obtenu qu'après le 6^{ème} jours de traitement. Ce traitement a permis aussi la stimulation du pourcentage de germination des graines du blé avec 8% par rapport au contrôle.

Pour le poivron (**fig 21 c**), ce traitement a permis l'accélération de la germination, mais n'a aucun effet sur le pourcentage final de la germination. Le maximum des graines germées est obtenu au 5^{ème} jour, alors que le maximum chez les graines non traitées est obtenu qu'après le 7^{ème} jours.

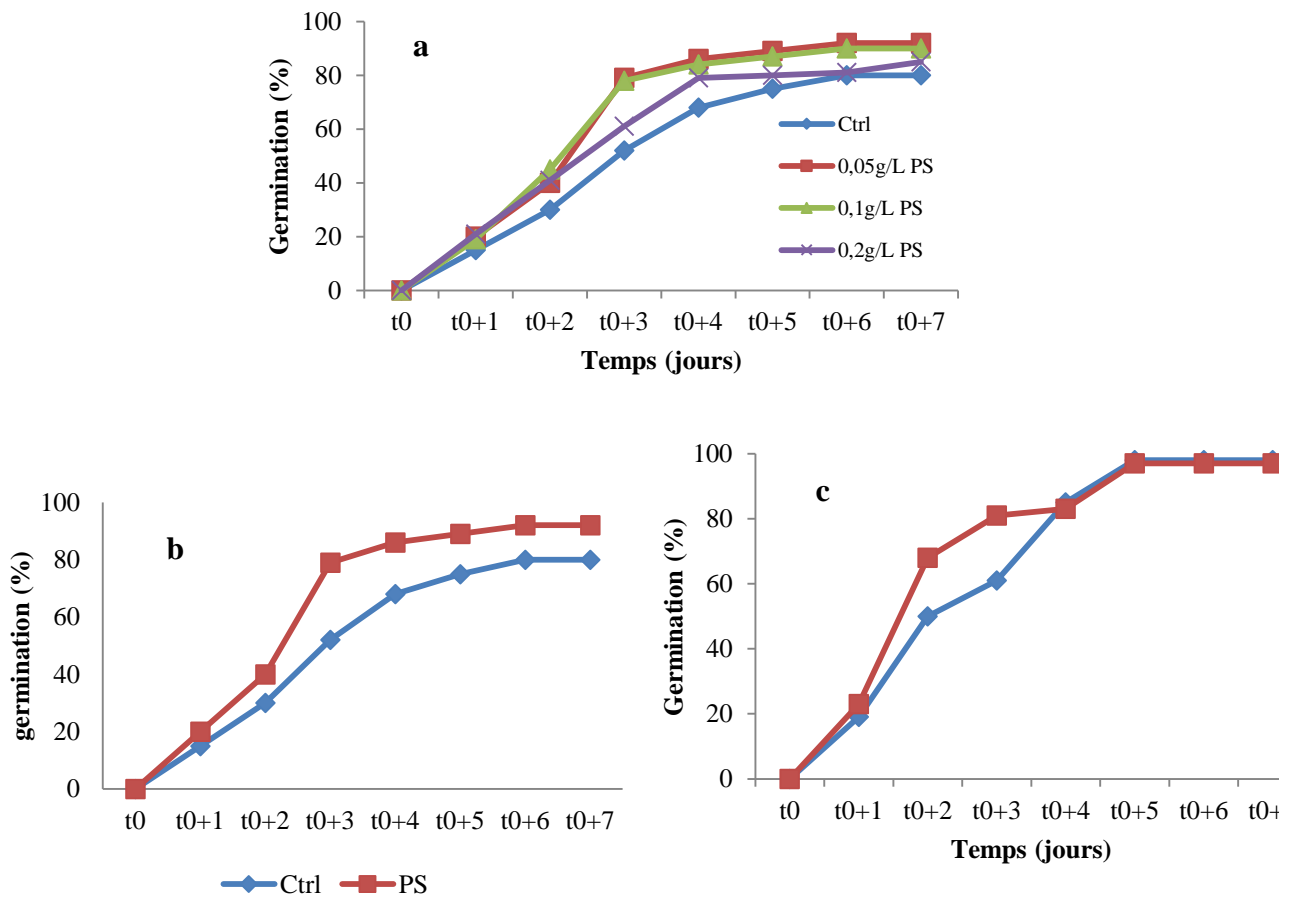


Figure 21: Effet des polysaccharides extraits de *A. platensis* à 0,05g/L sur le taux et la vitesse de la germination des graines de : blé (a), tomate (b), poivron (c).

Les graines ont germé dans des boîtes de Pétri à 25°C dans un incubateur à l'obscurité pendant 7 jours

La germination des graines est une étape très importante du cycle de croissance des plantes, cette étape subit habituellement des contraintes environnementales. Plusieurs études scientifiques ont proposé des solutions pour la stimulation de la germination des graines. L'extrait de l'algue *Gracilaria gracilis* a montré un effet de stimulation de la germination des graines de la tomate, poivron et l'aubergine avec une amélioration entre 52 et 68% par rapport au contrôle non traité (Demir et al., 2006). Une autre étude a montré que l'algue *Sargassum vulgare* a stimulé le pourcentage de la germination de la tomate (El-Din, 2015), dans ce sens, une formulation à base d'*Enteromorpha sp.* et *Cladophora sp.* a amélioré le pourcentage et la vitesse de la germination du blé (Dmytryk et al., 2015). L'importance des microalgues est révélée dans les dernières années par plusieurs études, l'utilisation des microalgues pour le développement des produits pour l'agriculture devient une piste très importante pour les scientifiques. Grzesik et son équipe ont montré que les espèces de microalgues : *Chlorella vulgaris* et *Spirulina platensis* présentaient un effet sur la stimulation de la vitesse et le taux de la germination du Maïs, ainsi que la stimulation de la croissance et le développement de ces plantes (Grzesik et al., 2014). De même, une autre étude a montré que *Phaeodactylum tricornutum* et *D. salina* ont stimulé la germination du poivron dans des conditions du stress salin (Guzmán-Murillo, 2013).

I.2. Effet sur la croissance des plantes

I.2.1. Effet sur la croissance de la tomate et du poivron

Les résultats obtenus et présentés dans la **figure 22 et 23** ont montré que l'application des polysaccharides (PS) à 0,1g/L sur les plantes a permis la stimulation de tous les paramètres de croissance des deux plantes testées. Une amélioration du poids des tiges a été observé atteignant 63,6% et 56,9% en comparaison au contrôle (**Fig 22 a**), alors que le poids racinaire a été amélioré avec 65% et 38,5% (**Fig 22 b**) pour la tomate (*Solanum lycopersicum*) et le poivron (*Capsicum annuum*) respectivement. Le même résultat a été obtenu pour la taille des plantes, par contre une amélioration de 23,2% et 17% par rapport au contrôle, a été notée chez la tomate et le poivron, respectivement (**Fig 22 c**).

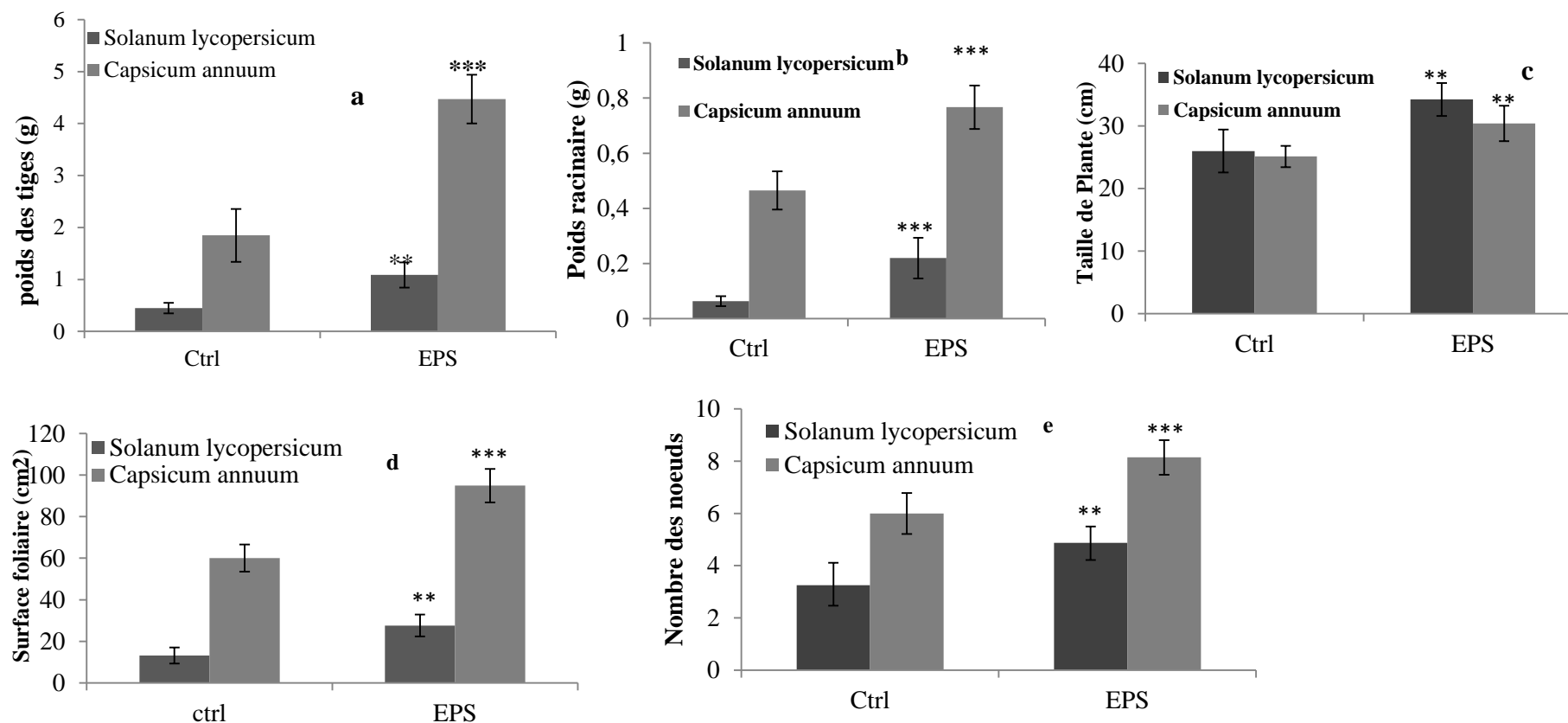


Figure 22: Effet des polysaccharides sur la croissance des plantes de la tomate (*Solanum lycopersicum*) et de poivron (*Capsicum annuum*).

Les plantes sont cultivées dans un mélange (sol/tourbe : 80/20). Les plantes ont été traitées avec une solution de 0,1g/L des polysaccharides de la spiruline, trois fois durant le cycle de culture (une fois après transplantation des plantules, une fois après 15 jours et une fois après 30 jours). Le poids (a et b), la taille (c), nombre de noeuds (d) et surface foliaire (e) Les plantes ont été mises dans un phytotron avec une photopériode 16h/8h, une humidité de 68%, et une température de 25°C. La différence entre les moyennes de chaque traitement a été analysée statistiquement avec l'analyse de la variance (ANOVA) en utilisant le test Tukey (logiciel IBM SPSS 20)



Figure 23 : Photo illustre l'effet des polysaccharides sur la croissance des plantes de la tomate (*Solanum lycopersicum*) et de poivron (*Capsicum annuum*).

Les plantes sont cultivées dans un mélange (sol/tourbe: 80/20), et traitées avec une solution de 0,1g/L des polysaccharides de la spiruline, trois fois durant le cycle de culture (une fois après transplantation des plantules, une fois après 15jours et une fois après 30jours) : e poids (a et b), la taille (c), nombre de nœuds (d) et surface foliaire (e) Les plantes ont été mise dans un phytotron avec une photopériode 16h/8h, une humidité de 68%, et une température de 25°C.

Plusieurs mécanismes sont connus pour jouer un rôle essentiel dans la croissance des plantes. Les mécanismes les plus fondamentaux sont, bien sûr, l'accès aux nutriments minéraux et organiques de base en quantité suffisante pour répondre aux besoins de la plante, et l'absorption effective de ces nutriments. Des nouvelles solutions ont permis l'amélioration de la croissance et la productivité des plantes. La stimulation de la croissance des plantes par les polysaccharides a été largement étudiée durant les dernières années (**Mishalak et al., 2016**). L'étude de **Gonzalez** a montré que les oligosaccharides extraits des algues a stimulé la croissance, ainsi que l'assimilation du carbone et de l'azote par les plantes (**Gonzalez et al., 2013**). Les polysaccharides algaux ont permis de stimuler la croissance et induire une élévation de la défense naturelle des plantes (**Standik et al., 2014**). **Garcia-Senin** a montré que l'extrait de *Chlorella pyrenoidosa* a permis la stimulation de la germination, la croissance et le développement de la tomate (**Garcia-Senin et al., 2013**). Une autre étude a montré que les polysaccharides et/ou les oligosaccharides ont un potentiel de stimulation de la croissance des plantes (**Calvo et al., 2014**). Dans le même sens, les oligosaccharides d'alginate extraits d'algue ont stimulé la croissance et le développement des plantes du blé (**Khan et al., 2009**). L'étude de **Zodape** a montré que la pulvérisation d'un extrait d'oligosaccharides d'algue *Ulva* sp a stimulé la croissance, et le développement des plantes, comme il a amélioré la qualité des fruits de la tomate (**Zodape et al., 2011**).

I.2.2. Effet sur la croissance du blé

Le résultat de la **figure 24** a montré une stimulation de la croissance des plantes de blé après le traitement des polysaccharides extraits d'*A. platensis*. Une amélioration du poids des tiges et racines avec 23% et 30% respectivement, même chose pour la taille des tiges et des racines qui a été amélioré avec 18% et 31,3% respectivement.

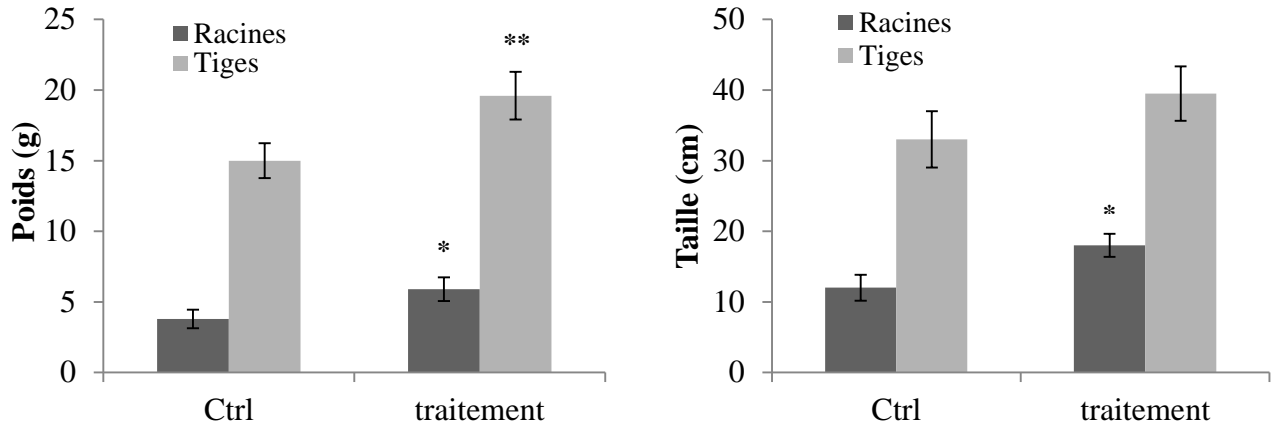


Figure 24: Effet des polysaccharides extraits d'*A.platensis* sur la taille et le poids du blé.

Les plantes sont cultivées dans un mélange (sol/tourbe: 80/20), et traitées avec une solution de 0,1g/L des polysaccharides, trois fois durant le cycle de culture une fois après transplantation des plantules, une fois après 15jours et une fois après 30jours), les plantes ont été mises dans un phytotron avec une photopériode 16h/8h, une humidité de 68%, et une température de 25°C. La différence entre les moyennes de chaque traitement a été analysée statistiquement avec l'analyse de la variance (ANOVA) en utilisant le test Tukey (logiciel IBM SPSS 20).

Plusieurs études ont montré que les polysaccharides et les oligosaccharides algaux ont un effet de stimulation de la croissance du blé, telle que l'étude de **Shahbazi et al., 2015** qui a montré que les polysaccharides extraits des algues *Ulva fasciata*, et *Gracilaria corticata* ont provoqué une stimulation de la croissance du blé, ainsi que les compositions biochimiques de cette plante (**Shahbazi et al., 2015**). L'extrait de l'algue *Gracilaria edulis* a permis aussi la stimulation du rendement du blé ainsi que la qualité nutritionnelle (**Shah et al., 2013**). Les polysaccharides extraits des bactéries ont montré un effet de stimulation du système racinaire des plantes de blé (**Ashraf et al., 2006, Lasik et al., 1979**). Récemment, les microalgues ont montré leur potentiel de stimulation des plantes, l'étude de **Grzesik et al., 2014** a démontré que les cyanobactéries *Microcystis aeruginosa* et *Anabeana* ainsi que l'espèce demicroalgue *Chlorella* sp, ont un effet sur la stimulation de la croissance des plantes de Maïs. De même, **Uysal et al., 2015** ont confirmé l'effet de *Chlorella vulgaris* sur la croissance du Maïs.

II. Conclusion

Dans ce chapitre nous avons étudié l'effet des polysaccharides extraits de la microalgue *A. platensis* sur la germination et la croissance des trois plantes économiquement importantes pour le royaume du Maroc (Tomate, poivron et blé). Après optimisation de la concentration efficace sur la germination, l'utilisation d'une solution des polysaccharides à 0,05g/L a permis d'accélérer la vitesse de la germination des trois plantes (blé, tomate et poivron), ainsi que l'amélioration du pourcentage de la germination des graines du blé et de la tomate.

Le processus de germination commence dès que la graine sèche est hydratée. Plusieurs facteurs externes et internes de la graine peuvent inhiber ou retarder la germination, ce qui influence négativement la croissance et la productivité des plantes. Le traitement des polysaccharides des microalgues apparaît comme une solution efficace et durable pour l'accélération de la vitesse et le pourcentage de la germination des graines.

L'utilisation d'une solution à base de 0,1g/L des exopolysaccharides extraits de la Spiruline (*A.platensis*) pour le traitement des plantes étudiées a permis de stimuler la croissance. Une amélioration de la taille des plantes avec 31,3%, 63,6% et 56,9% et le poids avec 30%, 23,2% et 17% pour le blé, tomate et poivron respectivement. Après la germination qui est la phase la plus critique pour l'installation et la stabilité de la plante, la stimulation de la croissance de la plante via les différentes voies métaboliques est une étape très importante pour la performance de la plante. Les polysaccharides des microalgues pourront être des activateurs des différentes voies métaboliques de la croissance telles que l'amélioration de l'activité photosynthétique, ainsi que, l'activation des enzymes responsable de l'assimilation des nutriments. Le traitement des plantes par les polysaccharides de microalgues seront des solutions efficaces qui pourront remplacer une partie des produits chimique ou bien un complément qui pourra rationaliser l'utilisation des produits conventionnels, et donc ces produits biologiques pourront apporter une valeur ajoutée pour l'amélioration de la productivité agricole dans le cadre d'une agriculture durable. D'ailleurs, l'activité des polysaccharides sur les plantes est largement décrite. Bien que le mode d'action de ces macromolécules sur les plantes ne soit pas encore connu, plusieurs études ont argumenté l'implication de ces molécules sur quelques voies métaboliques de la plante. Par exemple l'induction de la biosynthèse de la ribulose 1, 5 bisphosphate carboxylase / oxygénase (Rubisco), le glutamate déshydrogénase, pyruvate déshydrogénase, l'isocitrate déshydrogénase, l'inosine monophosphate déshydrogénase et glucose-6-phosphate déshydrogénase, qui sont les enzymes liés avec les différentes voies métaboliques de la plante tel que la photosynthèse, l'absorption et l'assimilation des nutriments. Ainsi l'implication de ces molécules dans l'induction de la voie de la fixation du carbone et de l'assimilation de l'azote.

Des études de la caractérisation et les mécanismes d'action des polysaccharides microalgaux sur la stimulation de la germination et la croissance des plantes, seront nécessaires pour la compréhension de l'effet de ces macromolécules sur la plante, et pour l'ouverture d'autres voies de l'amélioration de l'effet de ces produits.

Chapitre III: Etude approfondie sur la réponse physiologique et biochimique de la microalgue *Dunaliella salina* au stress salin et le criblage de l'effet des extraits de cette microalgue sur l'atténuation du stress salin sur la germination et la croissance des plantes étudiées.

Introduction

Les plantes sont soumises à un large éventail de stress biotiques et abiotiques, ce qui peut réduire considérablement leur croissance, leur développement et donc leur rendement apportant jusqu'à la mort (Monteiro et al., 2011). La salinité du sol est parmi les contraintes les plus nuisibles pour les plantes qui conduisent à de graves altérations métaboliques et physiologiques de la plante. Plus de 900 millions d'hectares de terres dans le monde entier, environ 20% du total des terres agricoles sont affectées par la salinité (Munns et al., 2002). La salinité est le facteur majeur des stress abiotique des zones arides et semi-arides dont le Maroc fait partie.

L'objectif de ce chapitre est l'étude de l'effet du stress salin sur la croissance et la biochimie de la microalgue halophile *D. salina*, avant d'étudier l'effet des différents extraits de cette microalgue sur la germination et la croissance des plantes cultivées dans des conditions du stress salin.

I. Etude de l'effet du stress salin sur la physiologie et la biochimie de la microalgue Halophile *D. salina*

L'objectif de cet axe est d'étudier le comportement physiologique et biochimique de la tolérance de la microalgue halophile *D. salina* à des concentrations élevées de salinité comme espèce modèle similaire aux plantes, et deuxièmement il vise à valoriser le potentiel de cette microalgue à tolérer la salinité pour la stimulation de la germination et la croissance des plantes dans les conditions du stress salin.

I.1. Effet du stress salin sur la croissance de *D. salina*

Dans le but d'étudier l'effet du stress salin sur la croissance de *D. salina*, nous avons mis en culture cette souche sur 4 concentrations de NaCl (0.5, 1, 2 et 4M de NaCl) avant de suivre leur croissance chaque deux jour.

La **figure 25** montre que cette souche a une capacité de croître dans des concentrations élevées de salinité. Une diminution modérée de la croissance a été notée avec l'augmentation de la salinité mais sans arrêt de la croissance.

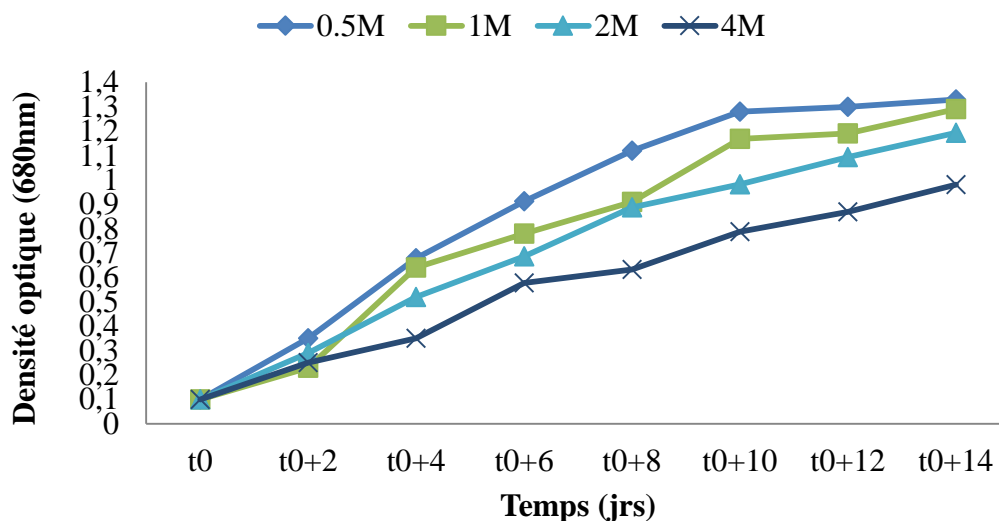


Figure 25: la croissance de *D. salina* cultivée dans le milieu Walne avec différentes concentrations de NaCl (0.5, 1, 2 and 4M) at 25°C, agitation 140rpm et une lumière continue de 5000lux.

D. salina est un microorganisme eucaryote photosynthétique qui peut vivre dans une salinité entre 0.05 et 5.5M (Chen et al., 2015; Garcia et al., 2007). *Dunaliella* tolère le stress salin avec l'accumulation de plusieurs molécules organiques telles que le glycérol et la β -carotène (Ghetti et al., 1999), et qui peuvent servir le rôle d'un osmorégulateur (Hadi et al., 2008). *D. salina* et *D. tertiolecta* ont présenté une tolérance à des concentrations élevées de salinité (0.05 à 4M de NaCl) (Takagi et al., 2006; Tammam et al., 2011).

I.2. Réponse biochimique de la tolérance de *D. salina* au stress salin

Dans le but d'étudier la réponse biochimique de cette souche au stress salin nous avons quantifié plusieurs molécules organiques dans la biomasse telles que la chlorophylle, les caroténoïdes, la proline, et les exopolysaccharides dans le milieu de culture.

I.2.1. Chlorophylles et caroténoïdes

L'effet de la salinité sur le taux des chlorophylles et des caroténoïdes de *D. salina* a été étudié. La **figure 26** a montré que le taux de la chlorophylle *a* été diminué avec l'augmentation de la salinité. Une réduction de la chlorophylle *a* avec 45%, 66% et 90% a été noté dans la biomasse

de *D. salina* cultivée à 1M, 2M and 4M de NaCl respectivement. Dans le même sens la chlorophylle *b* a diminué avec 75%, 77% et 89.6% chez *D. salina* cultivée à 1M, 2M et 4M de NaCl respectivement.

Contrairement à la chlorophylle, les caroténoïdes ont subi une accumulation par rapport au contrôle avec 45,3%, 217,22% et 346,18% à 1M, 2M and 4M NaCl respectivement.

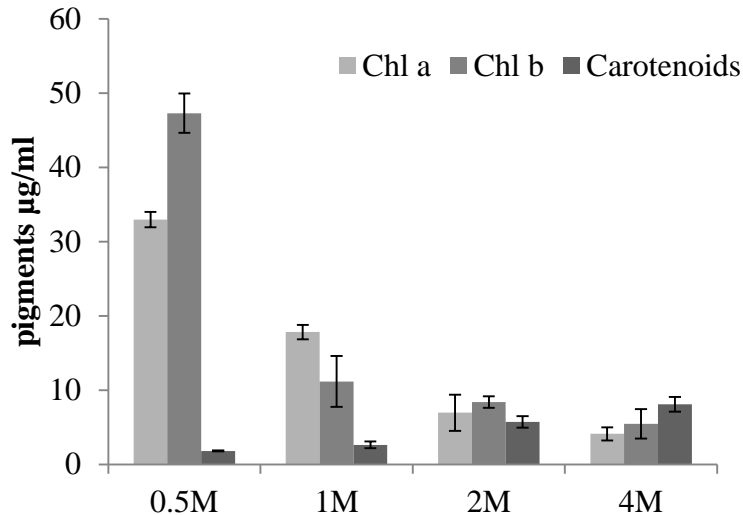


Figure 26: Taux de la Chlorophylle et les caroténoïdes dans la biomasse de *D. salina*. *D. salina* a été cultivée dans le milieu Walne avec différentes concentrations de NaCl (0.5, 1, 2, 4M), à une température de 25°C, pH 7.8 et une luminosité continue de 5000lux pendant 14 jours.

Une meilleure accumulation des caroténoïdes dans *D. salina* a été obtenue dans des salinités élevées (Borowitzka et al., 1990; Cray et al., 2013, Fachet et al., 2016). Le ratio Carotenoides/chlorophylles a augmenté, 0.09, 0.37 et 0.84 dans la biomasse de cette microalgue cultivée à 1M, 2M, 4M de salinité en comparaison avec le contrôle qui était de 0.023. Une similarité avec notre résultat a été notée pour le ratio carotenoides/chlorophylles qui a augmenté avec l'augmentation de la salinité dans le milieu de culture de *D. salina* (Araujo et al., 2009). L'accumulation des caroténoïdes parmi d'autres molécules, en grande quantité dans les cellules de *D. salina* est une stratégie d'adaptation de cette microalgues avec le stress salin (Belhaj et al., 2017; Xiang-Jun et al., 2015).

I.2.2. La proline dans la biomasse de *D. salina*

La proline est une molécule osmoprotectrice qui intervient dans la tolérance des plantes au stress salin. L'accumulation de cette molécule dans la biomasse de *D. salina* cultivée dans différents niveaux de salinité pendant 14 jours a été doublée. La figure 27 a montré que la

proline a augmenté lorsque la salinité a été doublé (1M) par rapport au contrôle (0.5M: salinité de l'eau de mer) avant sa diminution dans 2M et 4M de NaCl dans le milieu de culture.

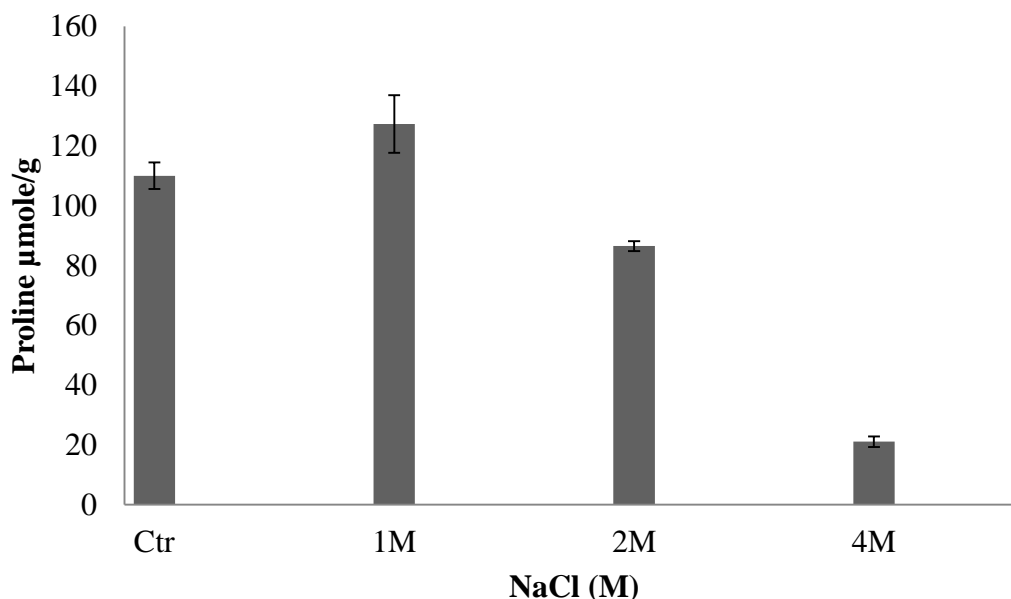


Figure 27: Accumulation de la proline dans la biomasse de *D. salina*.

D. salina a été cultivée dans le milieu Walne avec différentes concentrations de NaCl (0.5, 1, 2, 4M), à une température de 25°C, pH 7.8 et une luminosité continue de 5000lux pendant 14 jours.

La proline joue un rôle dans la stimulation de la tolérance aux stress environnementaux des plantes et microorganismes (Surasak et al., 2002). Elle est l'une des métabolites qui améliorent la résistance au stress oxydatif, soit dans les microalgues ou des plantes, comme elle améliore la tolérance au stress salin (Hiremath et al., 2010 ;Hong-Qi, 1985).

I.2.3. Les exopolysaccharides dans la culture de *D. salina*

Les exopolysaccharides produits par *D. salina* sont récupérés du milieu de culture après le 14^{ème} jour de culture. La figure 28 a montré que la quantité des exopolysaccharides a été augmentée avec l'augmentation de la salinité dans le milieu de culture, pour atteindre le maximum (880,43mg/L) à 4M de NaCl.

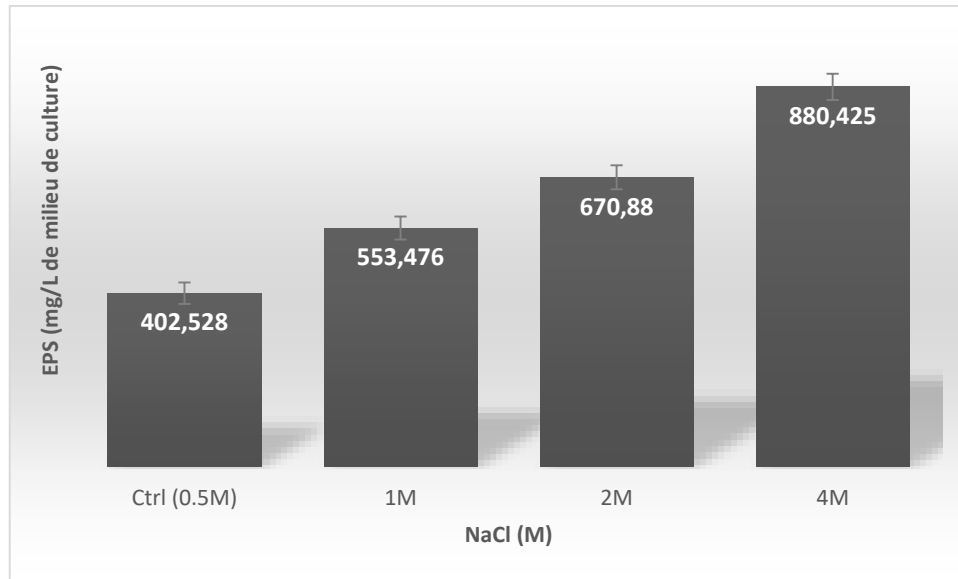


Figure 28: La production des exopolysaccharides par *D. salina*.

D. salina a été cultivée dans le milieu Walne avec différentes concentrations de NaCl (0.5, 1, 2, 4M), à une température de 25°C, pH 7.8 et une luminosité continue de 5000lux pendant 14 jours.

La production des exopolysaccharides a été améliorée par l'augmentation de la salinité dans le milieu de culture de plusieurs microalgues marines (Liu et al., 2000; Taraldsvik et al., 2000). Plusieurs stress environnementaux stimulent la production des carbohydrates extracellulaires (Priester et al., 2006). L'étude de Ozturk, 2006 a montré que la quantité des exopolysaccharides a augmenté par rapport au contrôle chez trois souches de microalgues marines cultivées dans des salinités élevées. Dernièrement la caractérisation des exopolysaccharides de *D. salina* par la technique FT-IR confirme la présence d'un groupement amine, des composés aromatiques, un groupement halide, un groupement aliphatique et des polymères carbohydrates. Les exopolysaccharides de *D. salina* ont composés des aldohexoses (glucose et galactose), de ketohexose (fructose) et de pentose (xylose). La même étude a montré que la variation de la salinité n'a aucune influence sur la composition des exopolysaccharides de *D. salina* (Mishra et al., 2011). Les exopolysaccharides ont un rôle très important dans la résistance des plantes au stress salin (Li et al., 2017; Liu et al., 2017).

II. Effet des extraits de *D. salina* sur la germination et la croissance des plantes de blé

Après l'étude de l'effet du stress salin sur la croissance et la biochimie de *D. salina*, nous avons étudié l'effet des différents extraits de cette microalgue cultivée dans différentes concentrations de NaCl sur la germination et la croissance des plantes dans les conditions du stress salin.

II.1. Effet de la biomasse hydrolysée de *D. salina* sur la germination et la croissance du blé

L'effet des hydrolysats de la biomasse de *D. salina* cultivée dans les différentes salinités sur la germination et la croissance des plantules du blé a été étudié.

Les résultats de la **figure 29** ont montré que les hydrolysats de la biomasse de *D. salina* ont un effet sur la stimulation de la germination des graines du blé dans les deux conditions du stress salin (3g et 6g/L de NaCl).

L'extrait de *D. salina* cultivée dans une salinité de 1M de NaCl (Extrait 1M) a permis une amélioration de pourcentage de la germination avec 105,7% et 97,5% par rapport aux graines du blé stressées dans la salinité 6g/L (**fig 29 a**) et 3g/L de NaCl (**fig 29 b**) respectivement. Alors qu'une légère amélioration de la germination des graines du blé a été notée dans les autres extraits. L'extrait qui a donné le maximum d'effet est l'extrait de *D. salina* cultivée à une salinité de 1M de NaCl, ce résultat est proportionnel avec l'accumulation des osmolytes dans la biomasse de cette microalgue cultivée à cette salinité, telles que la proline, et les caroténoïdes. La **figure 29c** a montré que les extraits de la biomasse de *D. salina* cultivée dans les différentes concentrations de salinité ont un effet de stimulation de la croissance des plantules (tiges et racines) dans les conditions normales par rapport au contrôle non traité. A partir de l'extrait 1M de *D. salina*, tous les extraits de la biomasse de cette souche cultivée dans les concentrations de salinité élevées ont un effet d'atténuation de l'effet du stress salin sur les plantules du blé cultivées dans les deux conditions du stress salin (3 et 6g/L de NaCl).

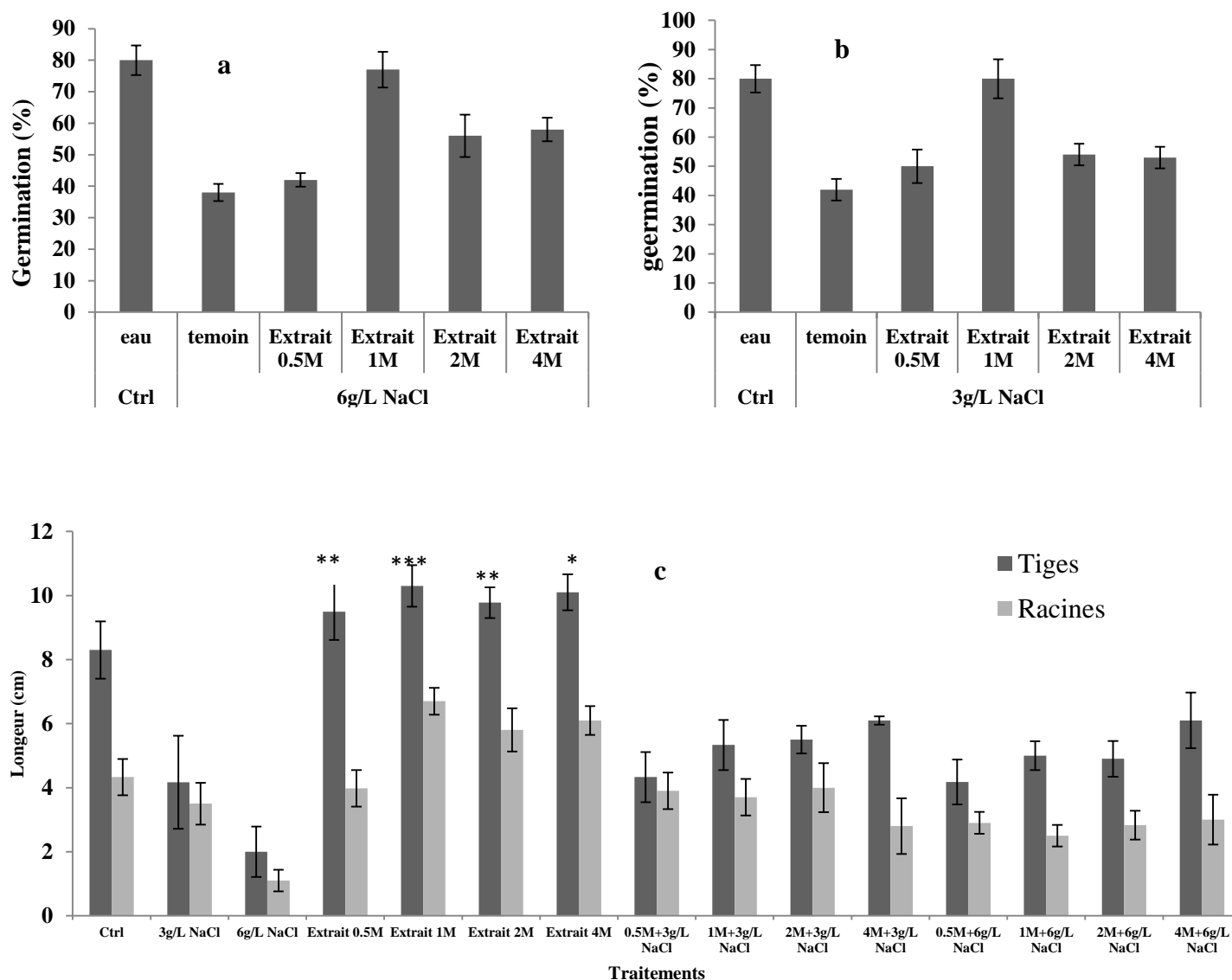


Figure 29: Effet des hydrolysats de *D. salina* cultivées dans différentes concentrations de salinité (0.5, 1, 2, 4M NaCl) sur le taux de la germination du blé et la taille des plantules dans des conditions de stress salin (3 et 6g/L NaCl).

Les graines ont germées dans des boîtes de pétri à une température de 25°C, traitées avec 0,1% des différents extraits, et incubées pendant 6 jours. Les plantules ont été mises dans des pots remplis du sol/tourbe (80/20) pendant 15j après germination. Fig a: graines du blé germées dans 3g/L de NaCl, fig b: graines du blé germées dans 6g/L de NaCl, fig c: taille des tiges et racines des plantules du blé. La différence entre les moyennes de chaque traitement a été analysée statistiquement avec l'analyse de la variance (ANOVA) en utilisant le test Tukey (logiciel IBM SPSS 20).

L'adaptation des plantes à la présence de sel dans le sol et au stress salin implique des processus très variés, intervenant à différents niveaux, de la cellule à l'organisme entier, comme par exemple une modification de l'activité métabolique conduisant à l'accumulation des osmolytes organiques (Ghars et al., 2008; Lopez-Carrion et al., 2008). Plusieurs études ont montré que

les extraits d'algues ont un effet sur l'atténuation de l'effet du stress salin sur la germination et la croissance des plantes, telles que l'étude de **Ghareib et al., 2010** qui a montré que l'extrait de *Sargassum virgatum* a un effet sur la stimulation de la germination de la tomate (**Ghareib et al., 2010**). L'extrait de *Ascophyllum nodosum* a accéléré la germination des graines de la tomate (**Basher et al., 2012**). Dans le même sens, l'extrait d'*Ulva rigida* a amélioré le potentiel du mécanisme antioxydative et stimule la croissance des plantes du blé dans les conditions du stress salin (**Chernane et al., 2015**). Pour les microalgues, l'étude de **El-Baky et al., 2010** a rapporté que les extraits de *Spirulina maxima* et *Chlorella ellipsoïda* ont un effet de stimulation du mécanisme antioxydative, de la germination et de la croissance des plantes du blé cultivées dans des conditions du stress salin (**El-Baky et al., 2010**), ce qui argumente le résultat obtenu dans notre étude.

II.2. Effet des molécules produites par *D. salina* sur la germination et la croissance des plantules du blé

L'étude de la culture de *D. salina* dans des salinités élevées, a montré que cette souche a accumulé quelques molécules telles que la proline et les caroténoïdes, ainsi elle a libéré des exopolysaccharides dans le milieu pour régler la pression osmotique.

Après l'étude de l'effet des extraits de la biomasse hydrolysée de *D. salina* cultivée dans différents niveaux de salinité sur la germination et la croissance des plantules du blé dans les conditions du stress salin, nous avons étudié l'effet des différentes molécules produites par cette microalgues dans les conditions du stress salin sur la germination et la croissance des plantules du blé dans les conditions du stress salin.

II.2.1. Effet de la proline exogène et les caroténoïdes extrait de *D. salina* sur la germination du blé

La **figure 30** a montré que le stress salin a permis la réduction du pourcentage de la germination du blé pour les deux concentrations (3 et 6g/L de NaCl). Une légère amélioration du pourcentage de la germination a été notée après le traitement des graines avec la proline exogène à différentes concentrations (**fig 30 a**). Alors qu'une légère augmentation non significative a été noté après traitement des graines avec 16mg/L de l'extrait des caroténoïdes de *D. salina* (**fig 30 b**).

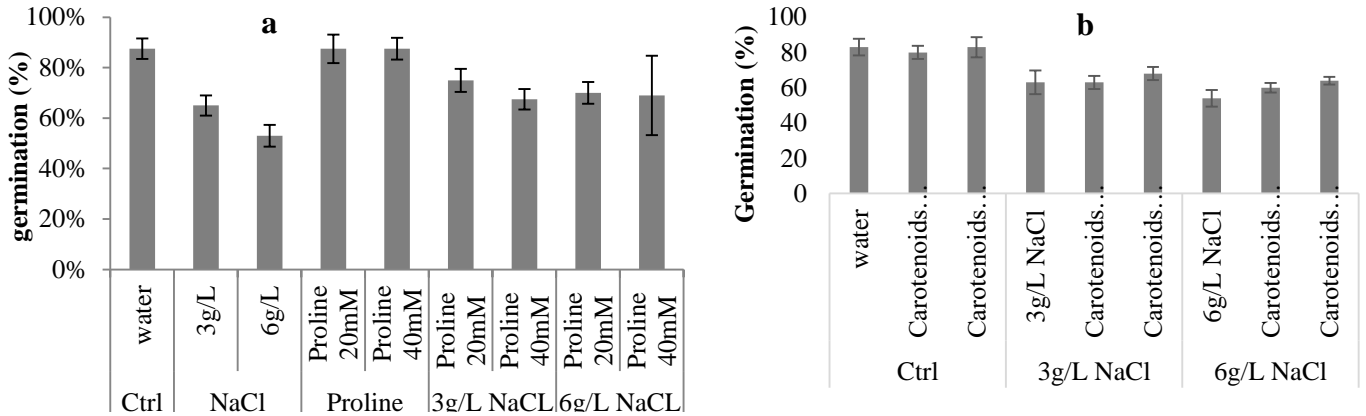


Figure 30: Effet des molécules produites par *D. salina* en réponse au stress salin sur la germination du blé.

a: Effet de la proline exogènes sur la germination, b: Effet des caroténoïdes extraits de *D. salina* sur la germination des graines de blé germées dans des boîtes de pétri pendant 7jours à 25°C à l'obscurité.

La proline est une molécule organique qui intervient comme osmoprotecteur dans la tolérance des plantes et des microorganismes au stress salin. Le traitement des graines de blé cultivées dans des conditions du stress salin par la proline à 40 et 50mM a permis l'amélioration du pourcentage de la germination (Mona et al., 2014 ; Talat et al., 2011).

Les caroténoïdes constituent, structurellement et fonctionnellement, un groupe très divers de pigments naturels de type polyène. Les caroténoïdes sont des constituants importants d'organites photosynthétiques de tous les plantes supérieures, les mousses, les fougères et les algues. Les caroténoïdes sont des pigments qui jouent un rôle majeur dans la protection des plantes contre les processus photo-oxydatifs. Ils sont des antioxydants efficaces contre l'oxygène moléculaire singulet et les radicaux peroxyde (Paiva et al., 1999). Les caroténoïdes sont connus comme désactivateurs physique et chimique efficaces de l'oxygène singulet ($1O_2$), ainsi que des fixateurs puissants d'autres espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Svetkovic et al., 2013; Fiedor et al., 2015).

II.2.2. Effet des exopolysaccharides de *D. salina* sur la germination et la croissance du blé

Les résultats de la figure 31 montrent que l'application du stress salin avec des concentrations de 3 et 6g/L de NaCl sur la culture du blé, a influencé négativement le pourcentage de la germination. Le pourcentage de la germination a subi une réduction avec 31,7% et 36,8% dans les conditions de 3g/L et 6g/L de NaCl respectivement. Ainsi que, les paramètres morphologique de la plantule tels que la taille des tiges qui a été réduite avec 45% et 60%, la

taille du système racinaire avec 23% et 75% à 3g/L et 6g/L de NaCl respectivement (**Fig 31 b**). Le poids de la partie aérienne et racinaire a été réduit aussi avec 80-90% dans les deux concentrations de NaCl appliquées. L'application des exopolysaccharides extrait de *D. salina* a permis la stimulation de la germination dans les conditions de stress salin. Une amélioration de 36,8 et 37,5% a été noté dans 3g/L et 6g/L de NaCl respectivement par rapport aux graines stressées non traitées (**fig 31 a**). La croissance des plantules traitées et surtout sur le poids de la plante a récupéré plus de 77% dans la partie racinaire et 50% de la partie aérienne par rapport aux plantes stressées à 3g/L de NaCl, alors qu'à 6g/L de NaCl le traitement des exopolysaccharides a montré une légère amélioration par rapport aux plantes stressées non traitées (**fig 31 c**).

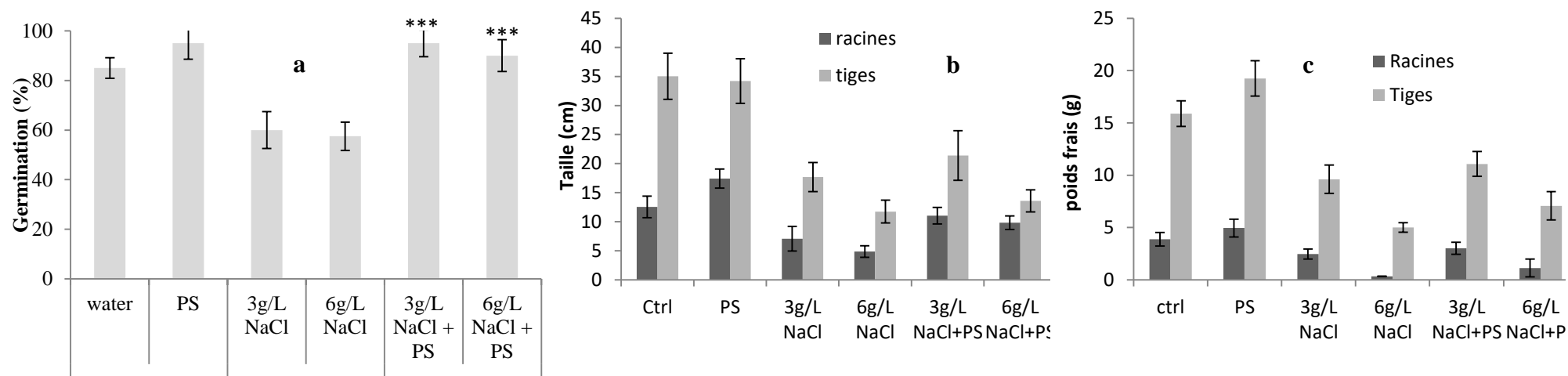


Figure 31: Effet de 0,1g/L des exopolysaccharides libérés par *D. salina* dans le milieu en réponse au stress salin sur la germination et la croissance des plantules du blé.

(fig 31a: Effet des exopolysaccharides libérés par *D. salina* sur la germination du blé, fig 31 d: Effet des exopolysaccharides libérés par *D. salina* sur la taille des plantules du blé, fig 31 e: photo illustrant l'effet des exopolysaccharides sur la taille des plantules du blé. Les graines du blé ont été germés dans des boîtes de pétri pendant 7jours à 25°C à l'obscurité. La différence entre les moyennes de chaque traitement a été analysée statistiquement avec l'analyse de la variance (ANOVA) en utilisant le test Tukey (logiciel IBM SPSS 20).

Plusieurs études ont montré que les exopolysaccharides ont un effet sur la tolérance au stress salin. L'étude de **He et al., 2017** a montré que les exopolysaccharides ont activé plusieurs voies métaboliques de la tolérance de la plante *A. thaliana* au stress salin. Une autre étude a montré que le traitement des plantes de riz cultivées dans des conditions du stress salin par le bêta-glycan dérivé des polysaccharides a stimulé les voies du potentiel antioxydant des plantes contre les ROS produits lors du stress salin (**Alhasnawi et al., 2017**). Une autre étude a montré que les exopolysaccharides produits par *Mesorhizobium alhagi* ont permis la stimulation de la résistance de la plante *Alhagi sparsifolia* au stress salin (**Liu et al., 2017**). Le résultat de ces études est en concordance avec nos résultats.

II.2.3. Effet des exopolysaccharides sur les Chlorophylles, anthocyanine et la proline chez les plantes du blé dans les conditions du stress salin

Les résultats présentés dans la **figure 32**, ont montré que le taux de la chlorophylle *a* n'est pas influencé par le stress salin, alors que la chlorophylle *b* a subi une légère diminution dans les conditions du stress salin (**fig 32 a**). Par contre l'anthocyanine est augmenté dans le cas du stress salin dans les deux concentrations de NaCl testées (3g et 6g/L). L'application du traitement des extraits bruts des exopolysaccharides avec 0,1g/L a permis la diminution du taux de l'anthocyanine dans les plantes cultivées dans des conditions du stress salin pour les deux concentrations de NaCl appliquées par rapport aux plantes stressées non traitées par les exopolysaccharides (**fig 32 b**). La proline a suivi la même tendance que l'anthocyanine, elle a subi une augmentation dans les deux conditions du stress salin, alors que les plantes traitées par les exopolysaccharides ont montré une atténuation de l'effet du stress salin sur l'accumulation de la proline (**fig 32 c**).

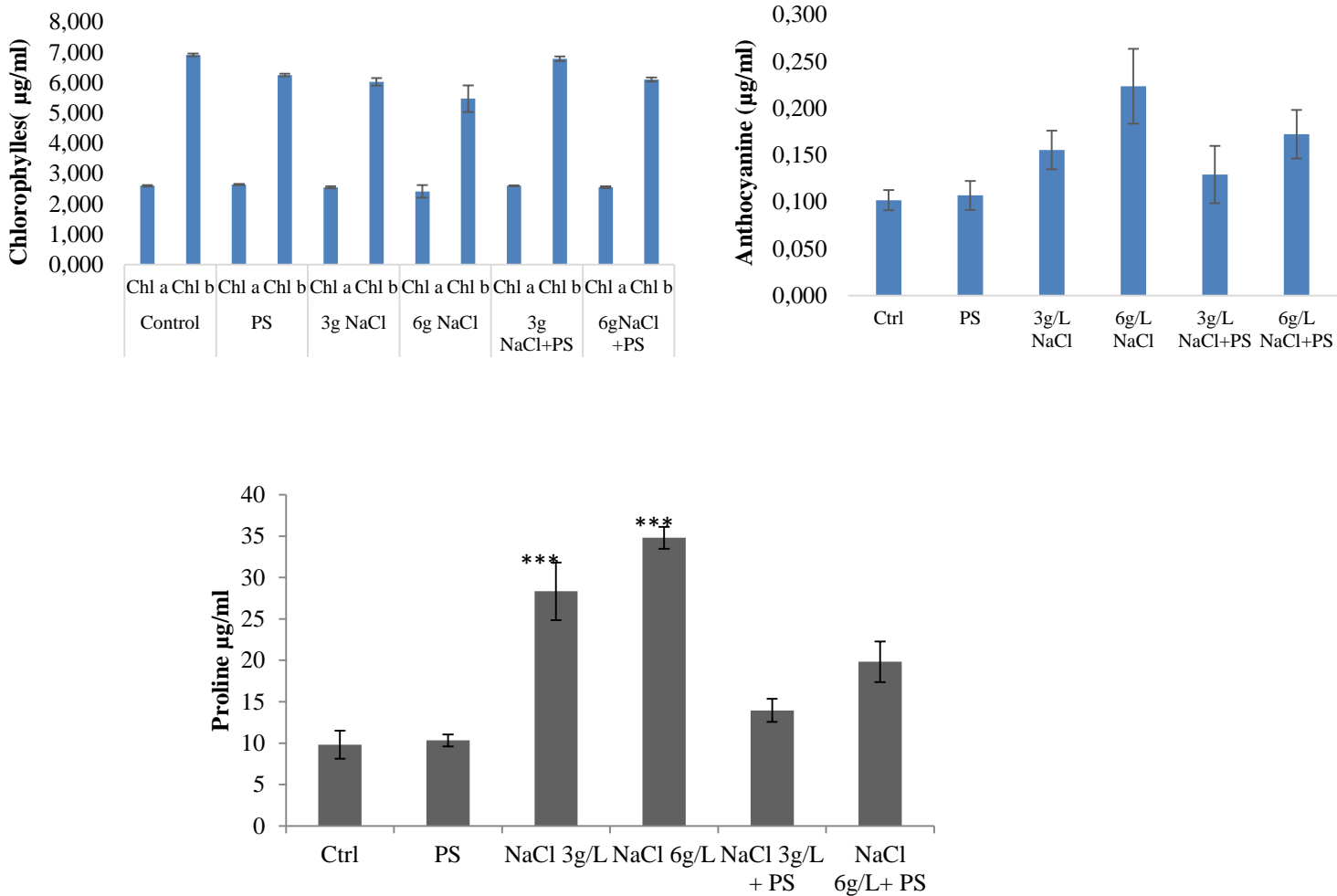


Figure 32: Effet de 0,1g/L des exopolysaccharides extraits de *D. salina* sur l'anthocyanine, chlorophylles et la proline des plantes du blé cultivées dans des conditions du stress salin (3 et 6g/L de NaCl).

Les plantes cultivées dans un phytotron à une température de 25°C, une humidité de 68% et une photopériode de 16h/8h pendant 40 jours. La différence entre les moyennes de chaque traitement a été analysée statistiquement par l'analyse de la variance (ANOVA) en utilisant le test Tukey (logiciel IBM SPSS 20).

La salinité cause le plus souvent une perte progressive de la chlorophylle conduisant à la réduction de l'absorption de la lumière par les feuilles, et donc une moindre accumulation de la matière sèche chez la plante. L'altération de la chlorophylle affecte le processus de la photosynthèse ce qui suggère que le degré de variation du contenu en chlorophylle peut être utilisé comme critère de sélection de la tolérance vis-à-vis du stress salin (Munns *et al.*, 2006). Ce résultat est en concordance avec notre résultat.

II.2.4. Effet des exopolysaccharides de *D. salina* sur l'activité enzymatiques des plantes du blé dans les conditions du stress salin

Le stress salin constitue un des facteurs qui limitent la productivité des cultures, la qualité et la quantité de leurs métabolites. Sous le stress salin, on assiste à la production des espèces

réactives de l'oxygène «ROS» (H_2O_2 ; O_2^- ; $1O_2$; et le groupement OH). Un excès de ces espèces réactives de l'oxygène entraîne des réactions toxiques telles que la peroxydation des lipides, la dégradation des protéines et la mutation de l'ADN (Pitzschke *et al.*, 2014).

Pour se protéger des effets des ROS, les plantes possèdent des enzymes appelées ROS-scavenging enzymes qui incluent la catalase (CAT), la peroxydase (POD) et superoxide dismutase (SOD) et l'ascorbate peroxidase (APX) (Farhangi-Abriz *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2017). L'activation du système enzymatique antioxydant est très importante pour la protection de la plante contre le stress salin. L'objectif de notre étude est d'étudier l'effet des exopolysaccharides des microalgues sur le comportement de l'activité des ROS-scavenging enzymes des plantes cultivées dans des conditions du stress.

Les résultats de la **figure 33** indiquent que le traitement des plantes de blé par les exopolysaccharides extraits de cette microalgue n'a pas induit une sur-activation significative des enzymes étudiées. L'activité de la catalase par exemple n'est pas influencée après application du stress salin aussi bien dans les plantes traitées que les plantes témoin. Ces résultats montrent que l'enzyme catalase ne semble pas intervenir dans l'atténuation du stress salin chez les plantes de blé étudiées.

Cette observation n'est pas valable pour la Peroxydase POD dont l'activité a été augmentée significativement dans les plantes stressées. Elle passe de 10265791U/mg à 66917620U/mg après application de 3g /L de NaCl dans sol puis à 80951780U/mg après application de 6g /L de NaCl. Après traitement des plantes de blé par les exopolysaccharides à 0,1g/L, l'activité de l'enzyme peroxydase n'a pas connu la même augmentation que celle enregistrée pour les plantes stressées non traitées, mais cette augmentation est statistiquement non significative.

L'activité de l'ascorbate Peroxydase (APX) mesurée chez les plantes de blé a montré une augmentation après application du stress salin. Chez les plantes traitées par les exopolysaccharides, cette augmentation est plus importante que chez les plantes témoin néanmoins ces différences sont non significatives.

Par contre l'activité superoxide dismutase (SOD) a subi une augmentation très significative après application du stress salin sur les plantes, alors que les plantes traitées avec les polysaccharides extraits des microalgues ont été diminuée significativement par rapport aux plantes stressées.

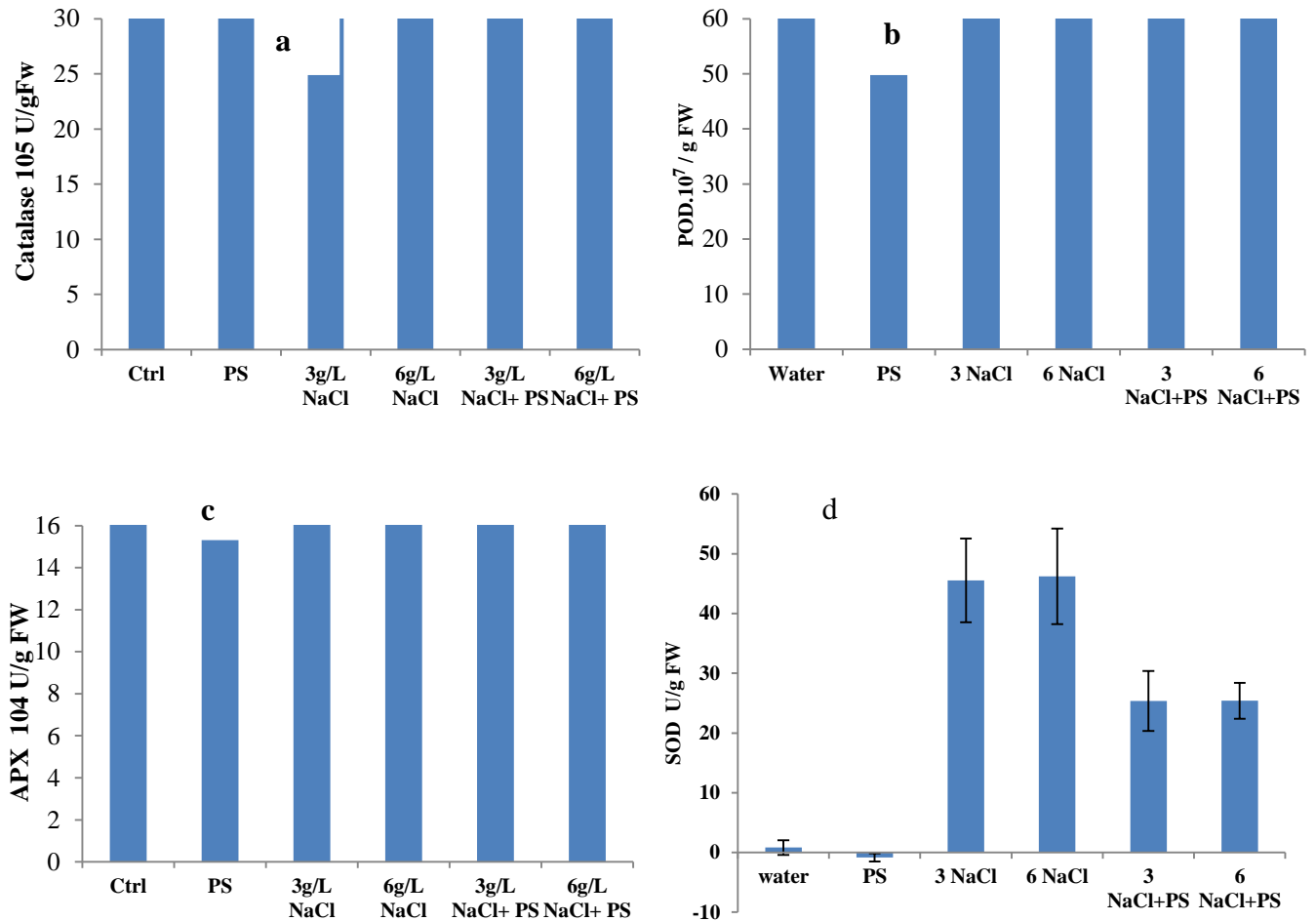


Figure 33: Effet des exopolysaccharides extraits de *D.salina* (0,1g/L) sur l'activité des ROS-scavenging enzymes des plantes du blé.

Les plantes sont cultivées dans des conditions du stress salin (3g/L et 6g/L de NaCl) à une température de 25°C, et une humidité de 68% pendant 40 jours.

Ces enzymes interviennent dans la détoxification des ROS synthétisés au cours du stress salin. Dans les conditions du stress salin, l'activité de ces enzymes devient plus importante pour éliminer les ROS, une corrélation positive entre l'efficacité de ce système de protection et la tolérance du sel a été mise en évidence chez de nombreuses plantes (**Benavides et al., 2000 ; Garratt et al., 2002**).

Plusieurs études ont montré que les exopolysaccharides ont un effet d'atténuation du stress salin sur les plantes (**He et al., 2017;Liu et al., 2017**), telles que l'étude de **Ashraf et al., 2004** qui a montré que les exopolysaccharides extraits des bactéries ont un effet sur la régulation du ratio Ca^{2+}/Na^{+} ainsi qu'ils ont un effet de stimulation de la croissance des plantes dans les conditions du stress salin. Une autre étude a montré que les extraits de deux microalgues (*Chlorella ellipsoïda* et *Spirulina maxima*) ont un effet comparable à notre résultat sur les ROS-scavenging enzymes des plantes du blé dans les conditions du stress salin, ce qui confirme le rôle des

polysaccharides dans l'amélioration du potentiel antioxydant des plantes contre le stress salin (EL-Baky et al., 2008). Le même effet des polysaccharides sur ces enzymes a été prouvé par l'étude de Ibrahim et al., 2014, qui a montré que l'extrait de l'algue *Ulva Lactuca* a permis de diminuer l'activité des enzymes APX, SOD et CAT, après leurs augmentations par le stress salin dans les plantules du blé. Les résultats de ces études montrent une concordance avec les résultats obtenus dans notre étude.

III. Effet des exopolysaccharides extraits de *D. salina* sur la germination et la croissance de la tomate et le poivron dans les conditions du stress salin

Après la confirmation de l'effet des exopolysaccharides extraits de l'algue halophile *D. salina* sur l'atténuation de l'effet du stress salin et la stimulation de la germination et la croissance du blé, nous avons élargi le spectre des plantes utilisées pour étudier l'effet de ces exopolysaccharides sur la tomate et le poivron cultivées sous stress salin.

III.1. Effet des exopolysaccharides de *D. salina* sur la tomate dans les conditions du stress salin

III.1.1. Effet sur la germination de la tomate

Les résultats présentés dans la **figure 34** montrent que le stress salin a influencé le pourcentage de la germination des graines de la tomate pour les deux concentrations de salinités. Le traitement de 0.05g/L des exopolysaccharides extraits de *D. salina* a permis la stimulation de la germination des graines avec un pourcentage presque équivalent au contrôle(non stressé) dans la condition de 3g/L de NaCl. Alors que pour la condition de 6g/L de NaCl ce traitement n'a aucune influence significative sur la germination des graines.

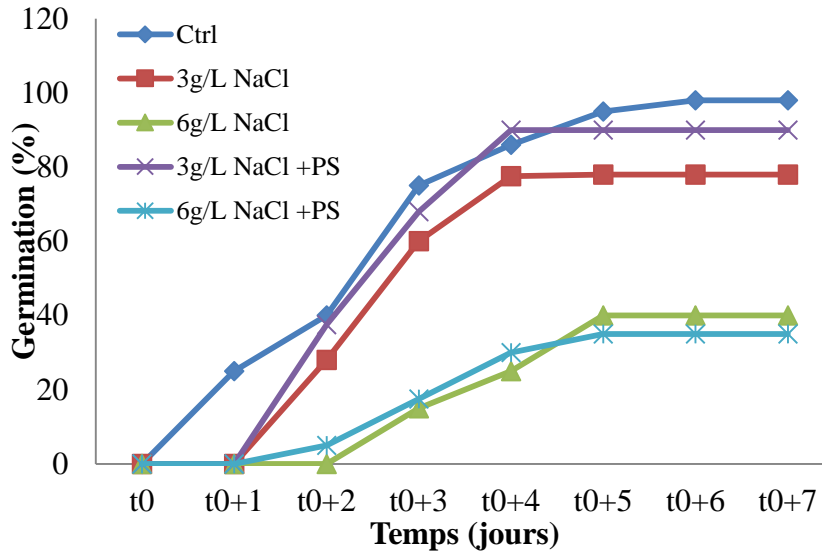


Figure 34: Effet des polysaccharides de *D.salina* sur la germination des graines de la tomate dans les conditions du stress salin (3 et 6g/L de NaCl).

Les graines ont été mises dans des boîtes de petri avec 100 graines par traitement (5 boîtes petri 20 graines pour chaque boîte) dans 6ml d'eau distillée et 0.05g/L de exopolysaccharides extraits de *D. salina* avec traitement NaCl (3 et 6g/L), les boîtes sont incubées à 25°C à l'obscurité pendant 7 jours. Les graines germées ont été comptées chaque jour.

La vitesse et le pourcentage de la germination des graines de la tomate sont influencés par le stress salin (Singh et al., 2012; Foolad et al., 2008, Al-Karaki et al., 2001). Plusieurs études montrent que les algues ont un effet de stimulation de la germination dans les conditions du stress salin, telles que l'étude de Demir et al., 2006 qui a montré que l'algue *Codium tomentosum* a amélioré la vitesse et le pourcentage de la germination des graines de la tomate dans les conditions du stress salin (Demir et al., 2006). Un mélange d'algues a été utilisé comme compost et a permis la stimulation de la germination et la croissance de la tomate dans les conditions du stress salin (Eyras et al., 2008). Les microalgues ont montré un effet de stimulation de la germination de la tomate dans les conditions du stress salin. Dans ce sens, l'extrait de *Chlorella vulgaris* a permis la stimulation de la germination de la tomate cultivée dans des salinités élevées (Escalante et al., 2015; Cortés-Jiménez et al., 2014).

III.1.2. Effet sur la croissance de la tomate dans les conditions du stress salin

III.1.2.1. Effet sur les paramètres morphologiques

Les résultats présentés dans la **figure 35** montrent que l'application du stress salin a influencé négativement les paramètres morphologiques de la tomate. La taille des tiges a été réduite avec 45% et 60% et la taille du système racinaire avec 23% et 75% à 3g/L et 6g/L de NaCl respectivement. Le poids de la partie aérienne et racinaire a été réduit aussi avec 80-90% dans les deux concentrations de NaCl appliquées. L'application des polysaccharides extraits des microalgues sur les plantes a atténuée un peu l'effet du stress salin et surtout le poids de la plante qui a récupéré plus de 15% dans la partie racinaire et 25% de la partie aérienne par rapport aux plantes stressées à 3g/L NaCl, alors qu'à 6g/L NaCl. En revanche, le traitement par les exopolysaccharides n'a pas montré une différence significative par rapport aux plantes stressées.

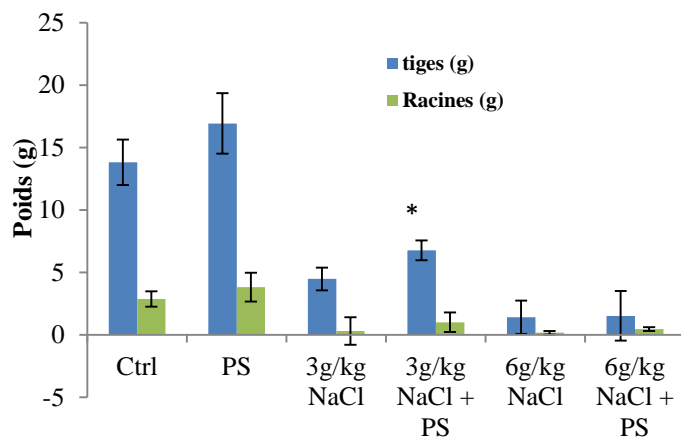
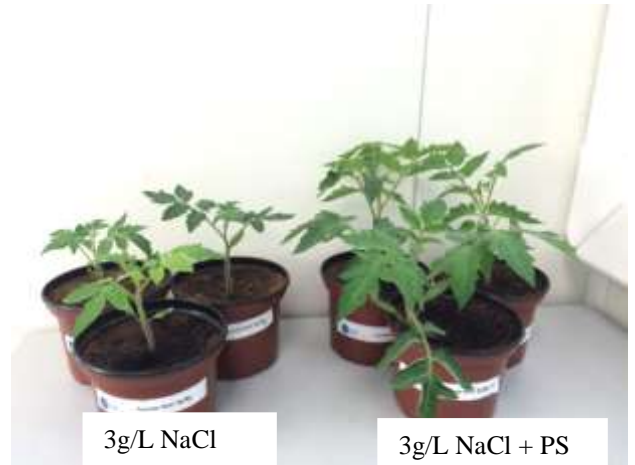
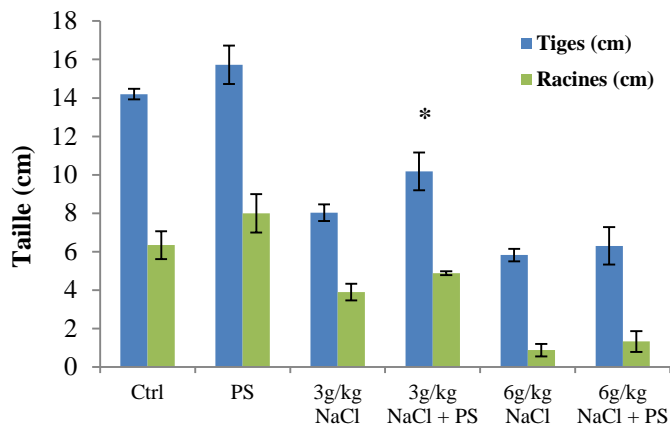


Figure 35: Effet des polysaccharides extrait de *D. salina* sur La croissance de la tomate. Les plantes de la tomate cultivée pendant 40jours dans de concentrations de NaCl (3g/L et 6g/L): a) taille des tiges et racines, b) poids des tiges et racines. Trois traitement de 0,1g/L des exopolysaccharides extrait de *D. salina* (1 : après transplantation des plantules germées, 2ème traitement : après 15j de transplantation et 3ème traitement : après 40j de transplantation). L'expérience est basée sur 10 réplicats/traitement (3 répétition).La différence entre les moyennes de chaque traitement a été analysée statistiquement avec l'analyse de la variance (ANOVA) en utilisant le test Tukey (logiciel IBM SPSS 20).

III.1.2.2. Effet sur la teneur de l'anthocyanine et les chlorophylles

La chlorophylle et l'anthocyanine sont des indicateurs importants de l'état physiologique des plantes. Le résultat présenté dans la **figure 36** montre que le taux de la chlorophylle et l'anthocyanine est inversement proportionnelavecl'état du stress salin. Le taux de la chlorophylle *a et b* a subi une diminution dans l'état du stress salin pour les deux concentrations de NaCl (3g et 6g/L), alors que l'anthocyanine est augmentée dans les deux concentrations NaCl par rapport aux plantes non stressées. L'application du traitement des extraits bruts des polysaccharides avec 0,1g/L, permis aux plantes de récupérer la perte de la chlorophylle dans les conditions du stress salin pour les deux concentrations de NaCl appliquées par rapport aux

plantes stressées non traitées par les polysaccharides. Alors que le taux de l'anthocyanine a diminué après traitement par les polysaccharides par rapport aux plantes stressées non traitées.

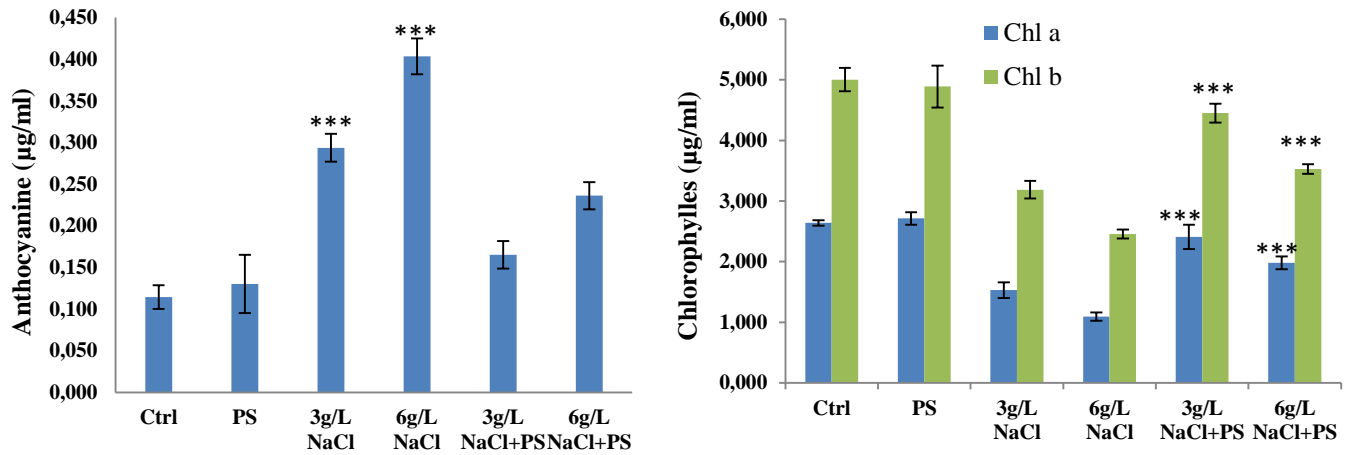


Figure 36: L'anthocyanine et les chlorophylles des plantes de la tomate cultivées dans des conditions du stress salin (3 et 6g/L de NaCl) et traitées avec 0,1g/L d'exopolysaccharides de *D. salina*.

Les plantes cultivées dans un phytotron à une température de 25°C, une humidité de 68% et une photopériode de 16h/8h pendant 40 jours. La différence entre les moyennes de chaque traitement a été analysée statistiquement avec l'analyse de la variance (ANOVA) en utilisant le test Tukey (logiciel IBM SPSS 20).

III.1.2.3. Effet sur l'activité des ROS-Scavenging enzymes de la tomate

L'effet de l'application des polysaccharides extraits de *D. salina* sur l'activité enzymatique dans les feuilles de la tomate est représenté sur la **figure 37**. Parmi les enzymes étudiées, la catalase et la peroxydase qui semblent être impliquées dans l'atténuation du stress salin chez la tomate, par contre l'ascorbate peroxydase n'est pas impliquée. L'activité de la catalase a significativement augmenté dans les plantes témoins assujetties à 6g/L de NaCl. Tandis que son activité n'est pas affectée par l'application des polysaccharides pour les plantes stressées pour les deux concentrations (3 et 6g/L de NaCl). L'activité de la peroxydase est restée constante dans tous les traitements.

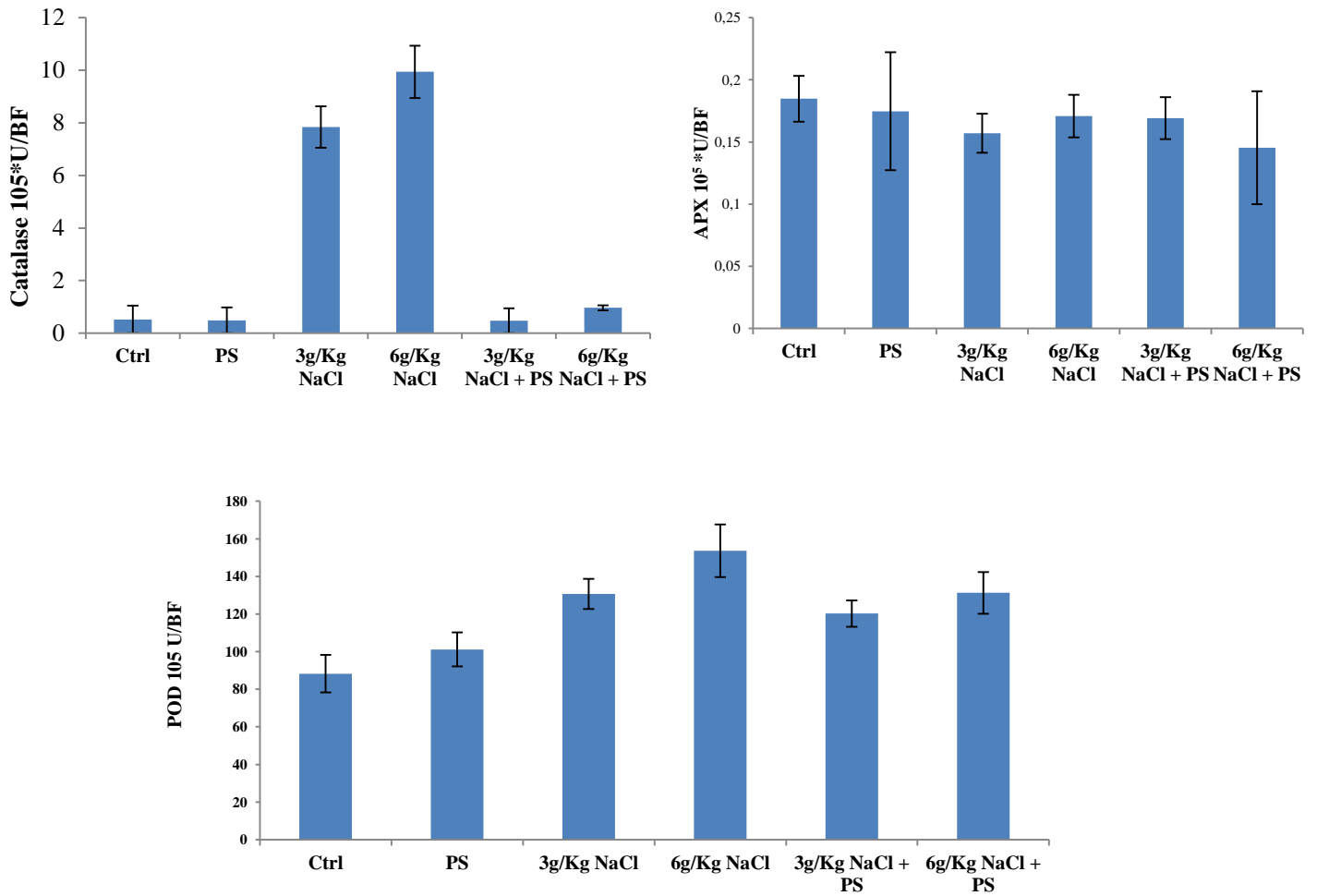


Figure 37: L'activité des enzymes ROS-Scavenging enzymes chez les plantes de la tomate cultivées dans les conditions du stress salin et traitées avec 0,1g/L des exopolysaccharides de *D. salina*.

(a) Catalase, (b) Peroxydase, (c) ascorbate peroxydase. Les plantes de la Tomate sont cultivées dans phytotron dans deux conditions du stress salin (3 et 6g/L NaCl), à une température de 25°C et une Humidité de 68%, avec une photopériode de 16h/8h pendant 40jours.

III.2. Etude de la réponse de la tomate au traitement des exopolysaccharides de *D. salina* dans les conditions de stress salin par l'analyse métabolomique basée sur la GC-MS

III.2.1. Profile lipidique

Dans cette étude, nous avons appliqué une métabolométrie par la chromatographie en phase gazeuse couplée au spectromètre de masse (GC-MS) pour analyser les réponses cellulaires des plantes de tomate au traitement des exopolysaccharides dans les conditions du stress salin. Dans les conditions analytiques optimisées, une bonne séparation des acides gras a été obtenue, ce

qui a permis la caractérisation chimique d'un total de 20 acides gras avec des chaînes carbonées entre C9 et C26. Les résultats présentés dans la **figure 38** montrent que le stress salin provoque une réduction de la biosynthèse de l'acide linoléique (C18:3), de l'acide hexadécatriénoïque (C16: 3) et de l'acide palmitique (C16: 0). Alors que le stress salin a induit la biosynthèse d'autres acides gras tels que l'acide azéique (C9: 0), C17: 0 (fig.35b) et les acides gras à chaîne très longue (VLCFA: C20-C26) (fig.35b). Les VLCFA ont augmentés de 3,5 fois par rapport au témoin non stressé (**fig. 38c**). Le traitement des plantes sous stress salin par des exopolysaccharides de *D. salina* a entraîné une diminution supplémentaire de la teneur en acide linoléique, en acide hexadécatriénoïque (**fig.38a**) et en VLCFA (**fig.38b, c**) par rapport aux plantes témoins et même aux plantes stressées non traitées. Les EPS, ont permis l'induction de l'acide palmitoleique (C16: 1) en comparaison avec les témoins et les plantes stressées non traitées (**fig.38b**).

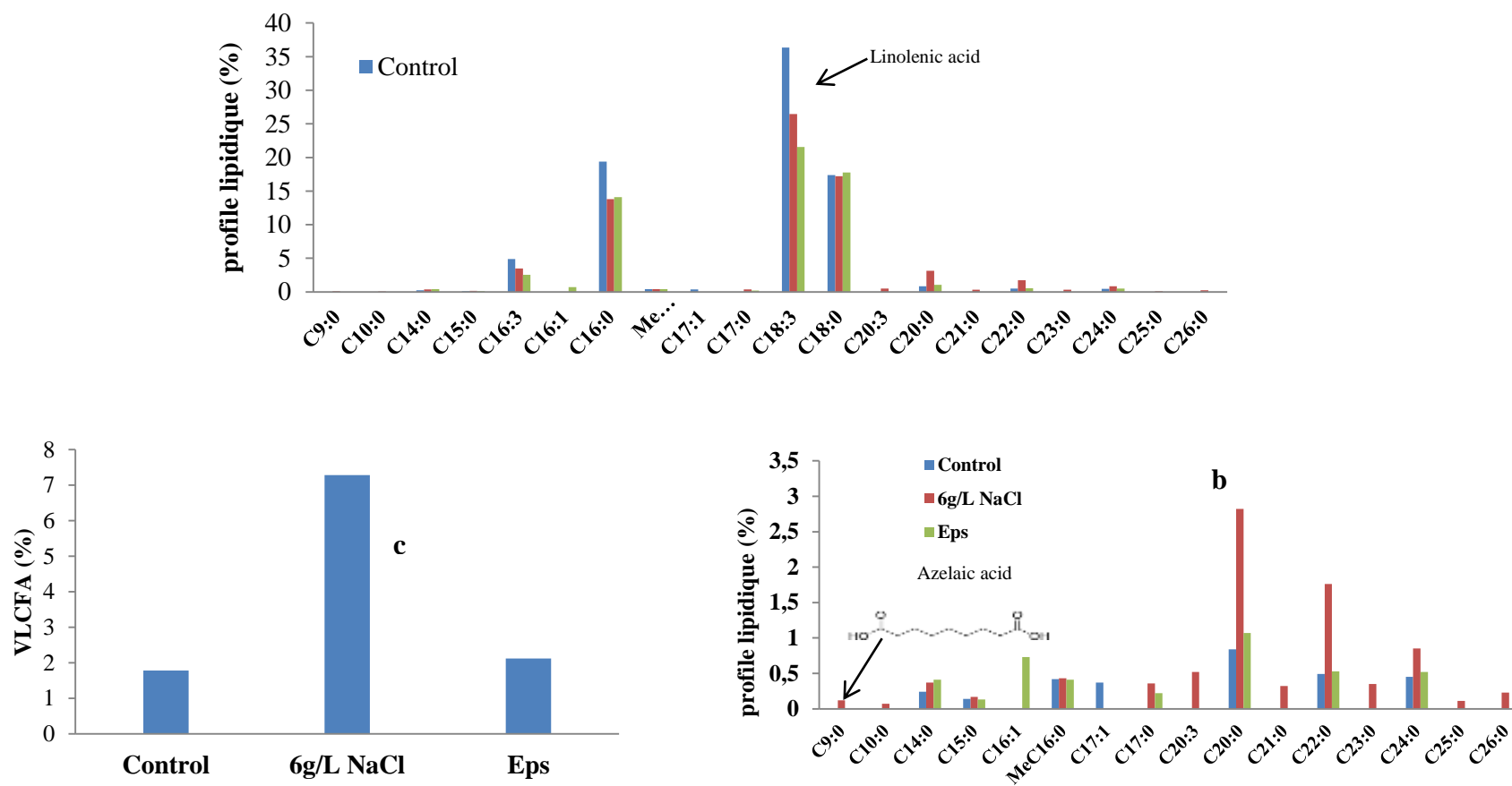


Figure 38: Effet des polysaccharides de *D. salina* sur le profile lipidique (a: les acides gras totaux, b: profile lipidiques à l'exception de l'acide linoléique, c: les acides gras de très longue chaîne (VLCFA: C20-C26)) des plantes de tomate cultivées dans des conditions de stress salin (6g/L de NaCl). Les plantes sont incubées dans une température de 25°C, 68% d'humidité avec une photopériode de 16h/8h et une luminosité de 240 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ pendant 40 jours. Ces plantes ont été traitées par une solution de 0,1g/L des exopolysaccharides extraits de *Dunaliella salina*.

Les plantes tolérantes aux stress abiotiques et biotiques réagissent en remodelant la fluidité de la membrane et en libérant de l'acide α -linoléinique (18: 3) des lipides membranaires. La modification de la fluidité membranaire est provoquée par des changements dans les taux d'acides gras insaturés, une fonction fournie en partie par l'activité régulée des désaturases d'acides gras (Upchurch et al., 2008). L'acide linoléinique est un précurseur de la biosynthèse du 13-hydroperoxyde impliqué dans la biosynthèse de l'acide jasmonique (JA), y compris la régulation des processus JA-dépendants (Pedranzani et al., 2003). Ce mécanisme pourrait expliquer la diminution spectaculaire de l'acide linoléinique dans les plantes stressées montrée par nos résultats. Aussi que le traitement des exopolysaccharides a provoqué encore une fois la diminution de cet acide, ce qui pourra être expliqué par la stimulation du mécanisme de la transformation de l'acide linoléinique en 13-hydroperoxyde nécessaire à la biosynthèse de l'acide jasmonique et donc l'induction de la voie de JA-dépendants. Ce dernier a permis l'induction des mécanismes de tolérance de la tomate au stress salin (Pedranzani et al., 2003). L'acide azélaïque prie les plantes d'accumuler de l'acide salicylique (SA), un signal de défense connu sur le stress (Jung et al., 2009). Dans notre étude, l'accumulation de cet acide dans les plantes stressées peut s'expliquer par l'état sévère du stress des plantes. L'inhibition de l'accumulation de l'acide azélaïque dans les plantes stressées après traitement par les exopolysaccharides de *D. salina* pourrait s'expliquer par l'atténuation de l'effet du stress salin sur les plantes de tomate. Les VLCFA sont connus pour jouer des fonctions générales importantes dans les interactions des plantes avec leur environnement. Une fonction principale de la cuticule est d'empêcher la perte d'eau non régulée, ce qui est particulièrement important pour la survie des plantes dans des environnements limités en ressources hydriques (Bourdenex et al., 2011). Dans notre étude, l'induction de la biosynthèse de VLCFA par la salinité a montré que la plante était sévèrement stressée, tandis que l'atténuation de l'accumulation de ces composés par le traitement d'EPS atténuait l'effet du stress salin sur la plante.

III.2.2. Analyse GC-MS de quelques molécules impliquées dans la tolérance de la tomate au stress salin

Après l'étude du profil lipidique, l'analyse métabolomique par GC-MS, a révélé plusieurs molécules impliquées dans la tolérance des plantes de tomate au stress salin telles que le 2,4-di-tert-butylphénol, le néophytadiène, le stigmastérol et Vitamine E (tocophérol). Les résultats de la **figure 39** ont montré que les plantes de tomate sous stress salin ont accumulé du néophytadiène, du stigmastérol, de la vitamine E (tocophérol) de manière proportionnelle avec

plus de 2,31, 1,14 et 1,26 fois par rapport au témoin, respectivement. Alors que le traitement par l'exopolysaccharide a permis l'induction de la biosynthèse du 2,4-di-tert-butylphénol avec une augmentation de presque 20 fois par rapport aux plantes contrôles et même aux plantes stressées non traitées avec des exopolysaccharides. Ce traitement a également permis une légère augmentation du néophytadiène avec 1,13 et 1,09 fois par rapport aux plantes témoins et aux plantes stressées non traitées, respectivement.

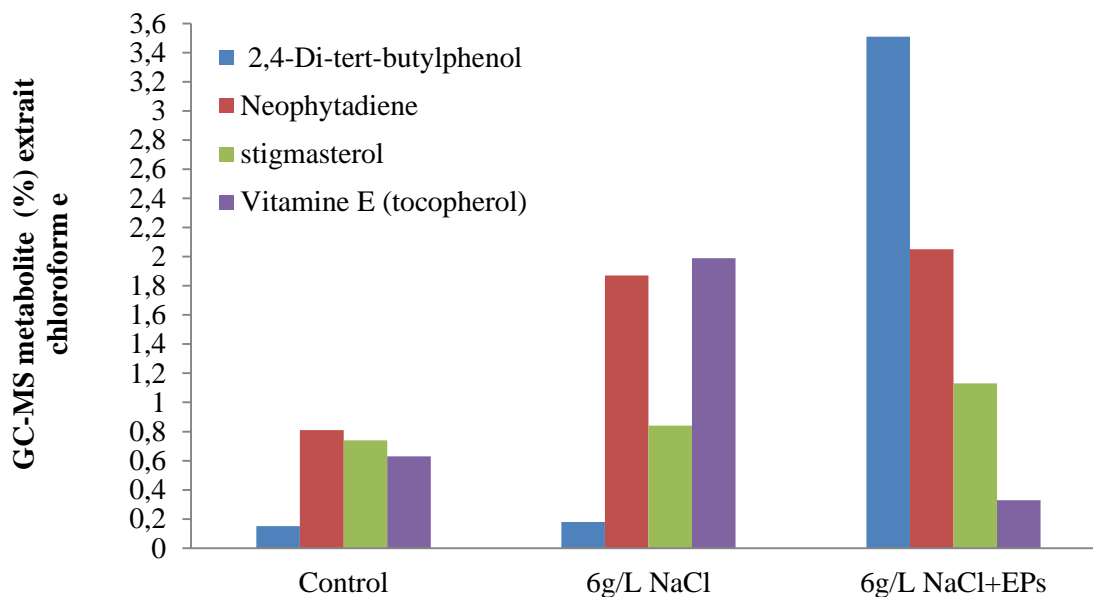


Figure 39: Effet des polysaccharides de *D. salina* sur les métabolitesantioxydantes détectées par l'analyse de GC-MS dans l'extrait chloroformique de la tomate.

Les plantesont été cultivées dans des conditions de stress salin de 6 g / L de NaCl et incubées à 25°C, 68% d'humidité avec une photopériode 16h/8h et une intensité d'illumination de 240 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pendant 40 jours et traitées avec une solution de 0,1g/L d'exopolysaccharides extrait de *D. salina*.

Le 2,4-di-tert-butylphénol est un antioxydantpuissant contre le stress salin (**Choi et al., 2013; Varsha et al., 2015**). Dans notre étude, une augmentation considérable de cette molécule a été observée dans les plantes de la tomate traitées avec des exopolysaccharides, ce qui pourrait s'expliquer par l'induction de mécanismes antioxydants contre le stress oxydatif. Dans le même sens, l'étude de**Li et al., 2009**, a montré que cette molécule a stimulé la germination et la croissance de trois plantes (aubergine, concombre et tomate) (**Li et al., 2009**). Le stigmasterol est une autre molécule qui a été accumulé considérablement dans les plantes stressées et traitée par 0,1g/L d'exopolysaccharides de *D. salina* par rapport au témoin et aux plantes stressées non traitées. Le stigmasterol est l'un des phytostérols, qui font partie intégrante de la bicouche lipidique membranaire des plantes (**Kumar et al., 2015**). Les phytostérols régulent la fluidité de la membrane pour influencer ses propriétés, ses fonctions et sa structure. Ils sont impliqués

dans la résistance innée et la tolérance des plantes aux stress abiotiques (**Kumar et al., 2015, Wang et al., 2012**). Une augmentation de l'accumulation de phytostérols, à savoir le campestérol, le stigmastérol et le β -sitostérol, a été observée chez le riz sous stress hydrique (**Kumar et al., 2015**). Le néophytadiène est une autre molécule accumulée après traitement des polysaccharides. Cette molécule est impliquée dans la biosynthèse de l'acide jasmonique. L'augmentation de cette molécule explique la diminution de l'acide linoléique (**fig. 38a**), précurseur de la biosynthèse de l'acide jasmonique, ce qui augmente la probabilité d'activation des voies de l'acide jasmonique-dépendantes par le traitement des plantes de tomate stressées par les exopolysaccharides microalgues. Le tocophérol est une molécule synthétisée suivant la voie shikimate et pourrait être liée à la voie salicylique, abscissique ou jasmonique (**Szarka et al., 2012**). Dans notre étude, l'accumulation de cette molécule dans les plantes stressées pourrait être expliquée par la souffrance de la plante sous stress salin, ce qui la pousse vers l'activation de toutes les voies qui pourraient atténuer l'effet de ce stress perturbant ainsi les différentes voies métaboliques de la plante. Malgré son potentiel antioxydant, le tocophérol, a généralement un faible effet sur la protection contre le stress oxydatif lié à la salinité (**Rasool et al., 2013**).

IV. Effet des exopolysaccharides extraits de *D. salina* sur la réponse du poivron dans des conditions du stress salin

IV.1. Effet sur la germination du poivron dans les conditions du stress salin

Les résultats présentés dans la **figure 40**, montrent que le stress salin a un effet négatif sur la germination des graines du poivron. Le traitement de ces graines par un extrait des exopolysaccharides, a permis une amélioration modérée du taux et de la vitesse de la germination dans les conditions du stress salin surtout à la concentration de 3g/L de NaCl alors que pour la concentration de 6g/L de NaCl ce traitement n'a aucun effet sur la germination.

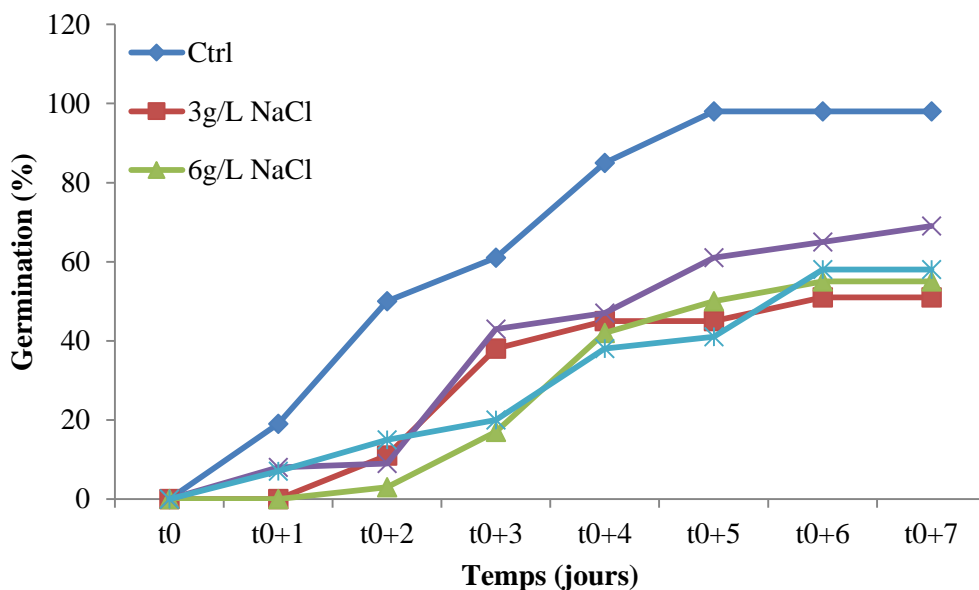


Figure 40: Evaluation de l'effet des polysaccharides de *D. salina* sur la vitesse et le pourcentage de germination des graines de poivron dans les conditions du stress salin (3 et 6g/L de NaCl). Les graines ont été mises dans des boîtes de pétri avec 100graines par traitement (5 boîtes pétri 20 graines pour chaque boîte) dans 6ml d'eau distillée et 0.05g/L de exopolysaccharides. Le traitement par NaCl pour les deux concentrations, et sont incubées à 25°C à l'obscurité pendant 7 jours. Les graines germées ont été comptées chaque jour.

Le pourcentage de germination des graines de poivron a subi une diminution très significative dans les conditions du stress salin (Aloui et al., 2014; Demir et al., 2008; Yildirim et al., 2006). Une autre étude a montré que les exopolysaccharides des microalgues *D. salina* et *P. tricornutum* ont un effet stimulant de la germination et du potentiel antioxydatif des plantules du poivron (Guzmán-Murillo et al., 2013). Les résultats obtenus par cette étude concordent avec ceux obtenus par la littérature.

IV.2. Effet des exopolysaccharides de *D. salina* sur la croissance du poivron.

IV.2.1. Effet sur les paramètres morphologiques du poivron

Les résultats présentés dans la **figure 41** ont montré que les plantes du poivron subissent une réduction très importante de la taille foliaire et racinaire dans les conditions du stress salin dans les deux concentrations (3 et 6g/L de NaCl). Après le traitement par les exopolysaccharides extraits de la microalgue halophile *D. salina*, les plantes ont récupéré leurs performances de points de vue taille et poids de la partie racinaire et foliaire des plantes traitées, par rapport aux plantes non traitées.

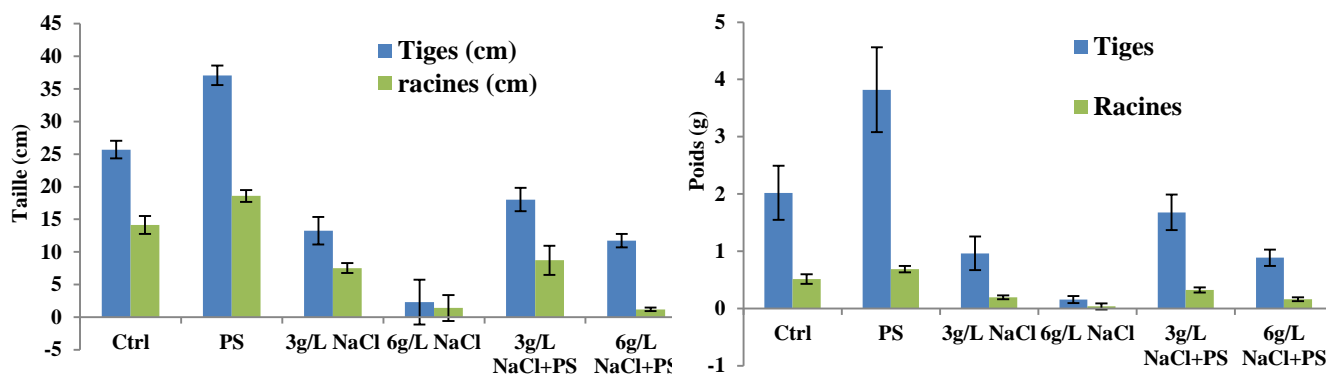


Figure 41 : Taille et poids des paramètres morphologiques des plantes de poivron cultivées dans des concentrations de NaCl (3g/L et 6g/L) et traitées avec 0,1g/L des exopolysaccharides de *D. salina*.

a) taille des tiges et racines, b) poids des tiges et racines. Les plantes cultivées dans phytotron dans deux conditions du stress salin (3 et 6g/L de NaCl), à une température de 25°C et une Humidité de 68%, avec une photopériode de 16h/8h pendant 40jours.

La croissance des plantes de poivron est influencée par la salinité élevée dans le sol et les eaux d'irrigation (Penella et al., 2016; Yin et al., 2014). Plusieurs études ont montré que les exopolysaccharides ont un effet sur l'atténuation de l'effet du stress salin sur les plantes et la stimulation de la croissance dans les conditions des stress salin. Quarashi et al., 2012 ont montré que les exopolysaccharides d'origine bactérienne ont un effet sur la stimulation de la croissance des plantes dans les conditions du stress salin (Quarashi et al., 2012). Dans le même sens, un extrait des polysaccharides algaux a stimulé la croissance des plantes de fenouil cultivées dans des conditions de stress (Mostapha et al., 2015)

IV.2.2. Effet sur l'anthocyanine et les chlorophylles

Les résultats présentés dans la figure 42 montrent que le taux de la chlorophylle et l'anthocyanine sont inversement proportionnelle. Le taux de la chlorophylle (a et b) a légèrement diminué dans des conditions de stress salin pour les deux concentrations de NaCl (3g/L et 6g/L), alors que le taux d'anthocyanine a augmenté pour les deux concentrations de NaCl par rapport aux plantes non stressées. Alors que pour les plantes cultivées dans les conditions de stress salin et traitées avec les exopolysaccharides (0,1g/L), le taux de la chlorophylle est comparable au contrôle. Alors que le taux de l'anthocyanine a diminué après traitement des exopolysaccharides par rapport aux plantes stressées non traitées.

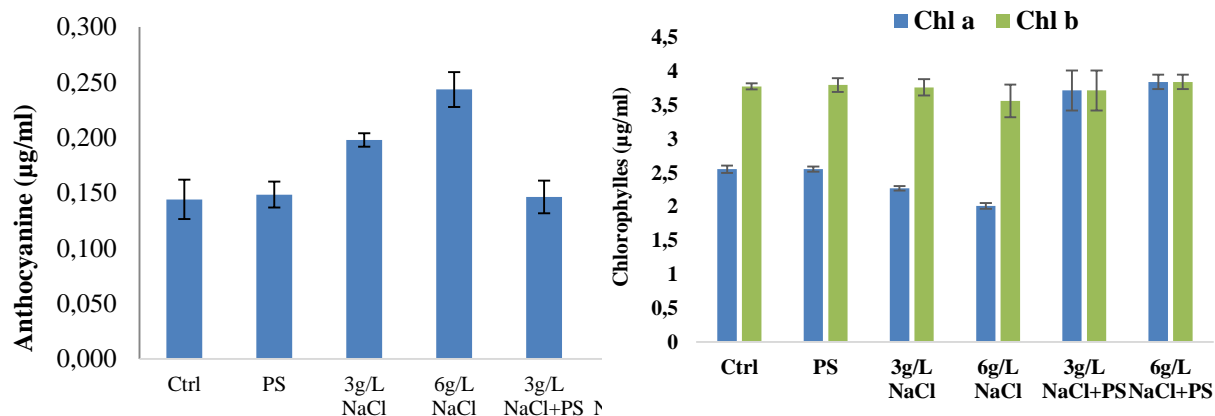


Figure 42: L'anthocyanine et les chlorophylles des plantes du poivron cultivées dans des conditions du stress salin (3 et 6g/L de NaCl) et traitées avec 0,1g/L des exopolysaccharides extraits de *D. salina*.

Les plantes cultivées dans un phytotron à une température de 25°C, une humidité de 68% et une photopériode de 16h/8h pendant 40 jours

IV.2.3. Effet sur l'activité enzymatique

La **figure 43** a montré que les activités des enzymes peroxydase et ascorbate peroxydase n'ont pas été influencées par le traitement par les exopolysaccharides. Leurs activités sont maintenues équivalentes au témoin, et parfois même moins après traitement par les polysaccharides. Par ailleurs, l'activité de la catalase a été influencée par le traitement des exopolysaccharides extraits de *D. salina*, l'activité de cette enzyme a subi une augmentation dans les conditions du stress salin pour les deux conditions, alors que le traitement des exopolysaccharides à 0,1g/L a permis l'atténuation de l'effet du stress salin chez les plantes de poivron.

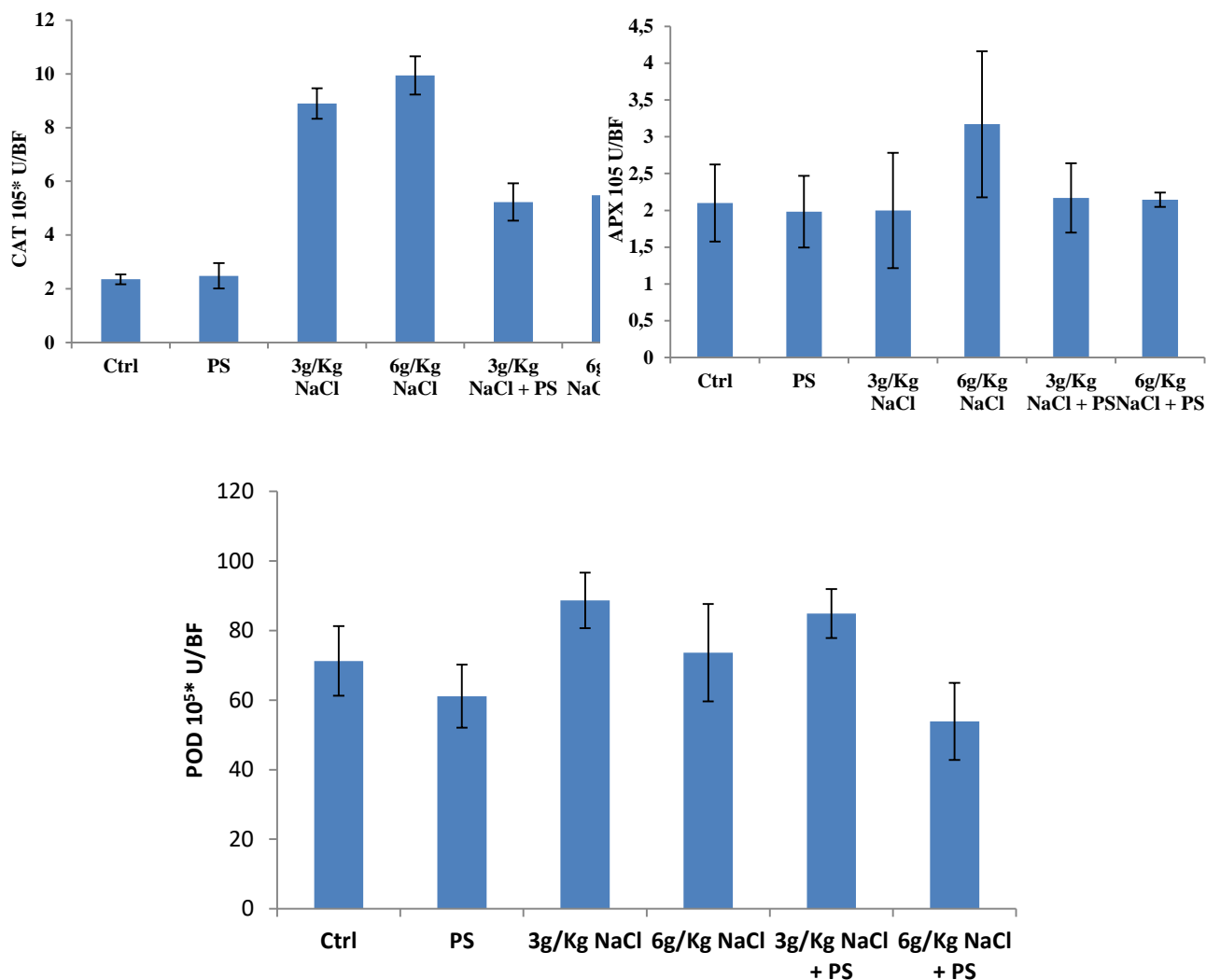


Figure 43: L'activité des enzymes du stress chez les plantes de poivron traitées par les polysaccharides de *D. salina*.

(a) Catalase, (b) Peroxydase, (c) ascorbate peroxydase. Les plantes cultivées dans un phytotron, dans deux conditions de stress salin (3 et 6g/L de NaCl) et traitées avec 0,1g/L exopolysaccharides, à une température de 25°C et une Humidité de 68%, avec une photopériode de 16h/8h pendant 40 jours.

V. Conclusion

Le comportement physiologique et biochimique de la tolérance de *D. salina* à des salinités élevées a été étudié dans ce chapitre, le suivi de la croissance a montré une tolérance de cette souche aux différentes concentrations de la salinité, qui peut tolérer jusqu'à jusqu'à 5.5M de NaCl. L'étude de la biochimie de *D. salina* cultivée dans différentes concentrations de salinité a montré que cette microalgue accumule quelques molécules organiques qui jouent le rôle d'osmorégulateurs et antioxydants intervenant dans l'adaptation de cette souche avec les contraintes du stress salin. Parmi les molécules 'osmoprotecteurs' accumulées nous citons la

proline qui a augmenté en parallèle avec l'augmentation de la concentration en salinité, la quantité maximale de la proline accumulée par *D. salina* a été notée à une salinité de 1M de NaCl dans le milieu de culture. Les caroténoïdes ont subi la même tendance que la proline, l'accumulation de ces molécules est proportionnelle avec l'augmentation de la salinité avec une quantité maximale obtenue à 4M de NaCl dans le milieu de culture. Par conséquent, une quantité très considérable d'exopolysaccharides a été libérée dans le milieu de culture, qui a été proportionnelle au taux de salinité pour atteindre le maximum à 4M de NaCl.

La deuxième partie de ce chapitre est l'étude de l'effet de ces molécules produites par cette microalgue halophile sur la germination et la croissance des plantes dans les conditions du stress salin.

Cette étude a montré que les extraits bruts de la biomasse hydrolysée de cette microalgues ont permis la stimulation du pourcentage de la germination des graines de blé avec 97,5% et 105,7% par rapport aux graines stressées à 3g/L et 6g/L de NaCl respectivement. Ce traitement a permis l'amélioration de la taille des plantules de blé avec un taux de 50% par rapport aux plantes cultivées à 3g/L de NaCl et non traitées.

Le criblage de l'effet des molécules accumulées par *D. salina* a montré un effet plus ou moins important sur la germination des graines de blé dans les conditions du stress salin, avec une amélioration très significative de la vitesse de la germination obtenue par le traitement à base des exopolysaccharides de cette souche.

Après l'effet positif des exopolysaccharides sur la germination et la croissance du blé cultivé dans les conditions du stress salin. L'effet de ces exopolysaccharides de *D. salina* a été étudié sur les plantes de tomate et le poivron. Ces exopolysaccharides ont montré un effet de stimulation de la germination et la croissance de la tomate et le poivron cultivées sous stress salin contrairement aux plantes stressées non traitées. Une amélioration de la taille de la tomate avec 25% pour la partie aérienne et 15% pour le système racinaire des plantes cultivées à 3g/L de NaCl par rapport aux plantes stressées avec 3g/L de NaCl et non traitées. Alors qu'à 6g/L de NaCl, le traitement n'a aucune influence significative sur la taille de la tomate par rapport aux plantes stressées non traitées. Une amélioration de la croissance des plantes de poivron a été notée dans les conditions du stress salin après le traitement de 0,1g/L des exopolysaccharides. La taille des plantes a été améliorée avec 31,7% pour les tiges et 70% pour les racines par rapport aux plantes cultivées à 3g/L de NaCl et non traitées par les exopolysaccharides.

Le traitement des exopolysaccharides a influencé même les molécules qui intervenaient dans la tolérance aux stress salin telles que l'atténuation du taux de l'anthocyanine dans les plantes dans les conditions du stress salin, l'accumulation de la proline et la stabilisation du taux de la chlorophylle diminué dans les conditions du stress salin. Pour les trois plantes, le taux de la chlorophylle a subi une réduction lors du stress salin pour les deux concentrations de NaCl étudiées (3 et 6g/L), alors qu'après le traitement des exopolysaccharides à une concentration de 0,1g/L, les plantes cultivées dans les conditions du stress salin ont récupéré les chlorophylles réduites. Une augmentation de l'anthocyanine a été observée dans les conditions de stress salin pour les trois plantes étudiées et pour les deux concentrations testées. Le traitement des exopolysaccharides a permis la réduction du taux de l'anthocyanine dans les plantes cultivées dans les conditions du stress salin. Le même effet que l'anthocyanine est observé pour la proline chez les trois plantes que ce soit dans les conditions du stress salin ainsi qu'après le traitement des exopolysaccharides de *D. salina*.

En plus de l'effet de ce traitement sur les molécules biochimiques, les exopolysaccharides ont montrés un effet sur l'activité des enzymes antioxydantes « ROS-Scavenging-enzymes ». Les différents traitements des plantes de blé n'a pas montré une différence significative au niveau de la synthèse ou de l'activité de l'enzyme catalase, alors que l'activité des enzymes SOD, POD et APX a augmenté de manière significative dans les conditions de stress salin, pour les deux concentrations étudiées. Alors qu'après traitement par les exopolysaccharides, l'activité de ces enzymes a subi une diminution pour revenir à la valeur du contrôle pour les trois plantes étudiées.

L'analyse métabolomique des plantes de tomate par GC-MS a montré que le traitement par les exopolysaccharides de *D. salina* a permis la régulation de l'activation et/ou inhibition de plusieurs précurseurs de différents métabolismes intervenant dans les voies de la tolérance des plantes aux stress telles que la voie de l'acide salicylique et la voie de l'acide jasmonique.

Ces résultats ont montré que les exopolysaccharides ont un effet d'atténuation de l'effet du stress salin sur les plantes. Des études sur les mécanismes d'action de ces exopolysaccharides, ainsi que la caractérisation structurale de ces produits pourraient élucider les voies impliquées suite aux traitements par ces exopolysaccharides. Ce qui pourrait ouvrir la possibilité d'améliorer l'effet de ces molécules et élargir le spectre d'utilisation de ces produits dans le but de rendre les terres salines exploitables pour l'agriculture.

RESULTATS ET DISCUSSION

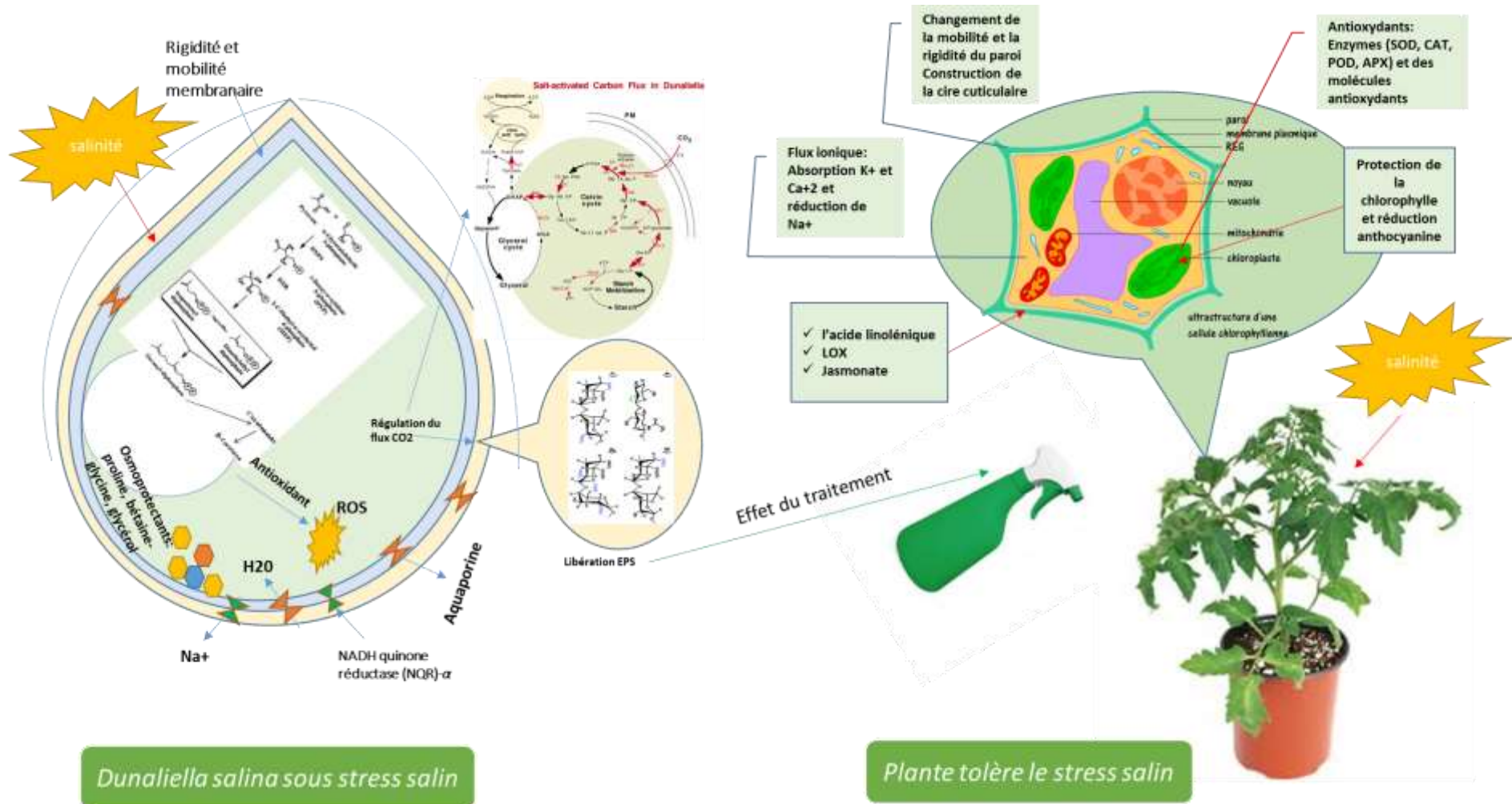


Schéma illustre la réponse biochimique de *D. salina* au stress salin et la réponse biochimique et métabolique de la tomate sous stress salin au traitement des substances accumulées par cette microalgue.

DISCUSSION GENERALE

L'évolution des pratiques agricoles constitue un impératif face aux pressions réglementaires et sociétales pour le développement d'une agriculture plus respectueuse de l'environnement. Dans ce contexte, les stratégies visant à privilégier les pratiques et les technologies respectueuses de l'environnement telles que les solutions biotechnologiques sont en plein essor. A ce titre, des stratégies relativement récentes visent à développer de nouveaux types d'intrants pour une agriculture durable. L'épandage d'extraits bruts des algues pour fertiliser les cultures est une pratique ancienne, utilisée dès l'antiquité. Plus récemment, plusieurs travaux de recherches ont été orientés vers la mise au point de procédés de purification des substances actives de ces extraits afin d'améliorer leur efficacité biostimulante et de développer des modes d'apports plus adaptés aux surfaces de cultures actuelles.

Dans ce contexte, outre l'identification des nouvelles espèces d'algues présentant des effets stimulants sur la croissance des plantes et la tolérance aux stress, une meilleure compréhension des mécanismes d'action de ces extraits s'avère essentielle.

Ainsi, ce travail de thèse s'appuie sur deux objectifs principaux. Le premier objectif étant d'étudier les conditions de culture, la croissance et la biochimie des espèces de microalgues choisies pour ce projet, et comme deuxième objectif le criblage de l'effet de ces microalgues de différents types (microalgues marines, microalgues d'eau douce, et cyanobactéries) sur la stimulation de la germination et la croissance des plantes dans les conditions normales et les conditions du stress salin.

L'étude de l'optimisation des conditions de culture a montré que chaque souche de microalgues a des conditions optimales de culture (milieu de culture, pH, T°C,...), et a montré que les conditions de culture ont un effet sur la croissance, la biochimie et la composition chimique des microalgues étudiées. Plusieurs études ont montré l'influence des conditions de culture sur la croissance et la biochimie des microalgues. **Ra et al., 2016** ont montré que l'intensité et la nature de la lumière a influencé le contenu lipidique des microalgues, ainsi que la durée de luminosité a influencé le taux de lutéine chez les microalgues (**Chiu et al., 2016**). Dans le même sens **EL Arroussi et al., 2015** ont montré que l'augmentation de la salinité a amélioré le taux de lipide chez la microalgue *D. tertiolecta*. La réduction de l'azote dans le milieu de culture a permis l'amélioration du contenu en polysaccharides chez *S. platensis* (**Salla et al., 2016**). L'ajout du

CO₂ dans la culture des microalgues a amélioré le rendement de la biomasse et la biochimie des microalgues (**Gonçalves et al., 2016; Mohsenpour et al., 2016**).

La caractérisation chimique et biochimique de la biomasse des microalgues choisies pour notre étude a montré que ces souches sont très riches en éléments NPK, en oligoéléments, en protéines, en lipides et en polysaccharides, ce qui montre leur potentiel chimique et biochimique pour stimuler la croissance et le métabolisme des plantes. Les microalgues ont montré dernièrement un potentiel pour le développement des produits pour l'agriculture (**Chojnacka et al., 2012; Priyadarshani et al., 2012; Carlsson, A. S. 2007; Sommerfeld, M. 2014; Uysal et al., 2015, Wuang et al., 2016**).

Les propriétés des extraits d'algues sont, selon la littérature, étroitement liées aux molécules ou aux groupements fonctionnels qu'ils contiennent. Le fractionnement et les modalités d'extraction choisies de ces extraits devraient donc permettre de modifier et d'augmenter les propriétés bio-stimulantes de ces extraits.

A cette fin, plusieurs types d'extraits de 6 souches de microalgues de ce projet dont 4 marines, 1 souche d'eau douce et une souche de cyanobactérie ont été testées pour leurs effets sur la germination et la croissance des plantes par une approche de criblage utilisant des paramètres de mesure simples.

Par ailleurs, les résultats obtenus ont permis de montrer que les extraits algaux, bien que d'origines différentes, présentent à priori des effets significatifs sur la germination et la croissance des plantes étudiées. Le résultat du premier criblage a montré que deux souches de microalgues ont montré un effet sur la germination et la croissance des plantes étudiées. Une amélioration de la vitesse et du taux de la germination des graines des trois plantes étudiées. Ainsi la croissance de ces plantes a été stimulée de 31,3%, 63,6% et 56,9% pour la taille et 30%, 23,2% et 17% d'amélioration du poids sec des plantes de blé, tomate et poivron, respectivement. Les résultats obtenus par cette étude sont similaires aux résultats de la littérature. A titre d'exemple, l'étude de **Grzesik et al., 2014** qui a montré que les microalgues *C. vulgaris* et *A. platensis* ont un effet sur la stimulation de la vitesse et le pourcentage de la germination du Maïs, en plus de la stimulation de la croissance et le développement des plantes (**Grzesik et al., 2014**). Une autre étude a montré que *P. tricornutum* et *D. salina* ont stimulé la germination du poivron dans les conditions du stress salin (**Guzmán-Murillo, 2013**). **Garcia-Senin, S. 2013** a démontré que l'extrait de *C. pyrenoidosa* a permis la stimulation de la germination, la croissance

et le développement de la tomate (**Garcia-Senin, S. 2013**). Les polysaccharides et/ou les oligosaccharides ont un potentiel de stimulation de la croissance des plantes (**Calvo et al., 2014**), à titre d'exemple, les oligosaccharides d'alginate extraits d'algue ont stimulé la croissance et le développement des plantes (**Khan et al., 2009**). Dans le même sens, la pulvérisation d'un extrait d'oligosaccharides de l'algue *Kappaphycus alvarezii* a stimulé la croissance, et le développement de la tomate, aussi elle a amélioré la qualité des fruits de cette plante (**Zodape et al., 2011**). Dans notre étude, le criblage des différents extraits de la microalgue *A.plateniss* et *D. salina* a montré que les fractions actives sont très riches en polysaccharides. Après précipitation, purification et analyse de ces polysaccharides, l'étude de l'activité de ces macro-biomolécules a montré un effet majoritaire sur la stimulation de la germination et la croissance des plantes étudiées. Vu l'intérêt économique et biologique de ces molécules, plusieurs études ont montré que plusieurs espèces de microalgues pourront être une source de production d'exopolysaccharides telles que *Chlamydomonas reinhardtii* (**Bafana 2013**), *Botryococcus braunii* (**Dayananda et al., 2007; Turu et al., 2016**), *Dunaliella tertiolecta* (**Goo et al., 2013**), *Porphyridium cruentum* (**de Jesus Raposo, 2014; Patel et al., 2013; Soanen et al., 2016**), *Spirulina sp* (**Chaiklahan et al., 2013; Kurd et al., 2015**) et *Isochrysis galbana* (**Sun et al., 2014**). Ces études ont montré l'intérêt des souches de microalgues marocaines choisies pour notre étude.

Les exopolysaccharides ont des activités biologiques très importantes, telles que l'activité anticancéreuse (**Kurd et al., 2015**), l'activité antivirale (**de Jesus Raposo, 2014**), l'activité antioxydante (**Sun et al., 2014**), et ayant montré des activités de stimulation de la croissance et le métabolisme des plantes. L'étude de **Sangha et al., 2010**, a montré que les exopolysaccharides sulfatés des algues ont un effet de stimulation de la résistance de la plante *Arabidopsis thaliana* contre *Sclerotinia sclerotiorum*. Ces exopolysaccharide sulfatés des algues ont également montré une activité d'élicitation de la défense naturelle des plantes de tabac contre le virus de mosaïque (**Ghannam et al., 2013**). Une autre étude a montré que les exopolysaccharides extraits de *P.tricornutum* et *D. salina* ont stimulé la germination du poivron dans des conditions du stress salin (**Guzmán-Murillo, 2013**). D'autres exopolysaccharides extraits des macroalgues ont un effet de stimulation de la croissance des plantes (**Godlewska et al., 2016; Khan et al., 2009; Saa et al., 2015**). Les résultats de notre étude sont en concordance avec ceux décrits dans la littérature. .

La deuxième partie de notre projet est l'étude de la tolérance de la microalgue halophile *D. salina* à des salinités élevées, avant d'étudier l'effet du potentiel biochimique de cette microalgue halophile sur la germination et la croissance des plantes dans les conditions du stress salin.

L'étude de la culture de *D. salina* à différentes concentrations de salinités (0,5, 1, 2, 4M de NaCl) a montré que la croissance de cette souche n'a pas subi une grande influence négative par l'augmentation de la salinité dans le milieu de culture. Cette tolérance de *D. salina* aux concentrations élevées de salinité est accompagnée par une accumulation des molécules organiques osmoprotectrices telles que la proline et les caroténoïdes, ainsi que la libération d'autres molécules dans le milieu extracellulaire pour la régulation de la pression osmotique telles que les exopolysaccharides.

D. salina est une chlorophycée halophile qui vit dans des salinité de 0,5 jusqu'à 5,5M (**Chen et al., 2015; Garcia et al., 2007; Takagi et al., 2006; Tammam et al., 2011**). *Dunaliella sp.* tolère le stress salin avec l'accumulation de plusieurs molécules organique telles que le glycérolet la β -carotène (**Chen et al., 2009; Ghetti et al., 1999**), et qui peuvent jouer le rôle d'un osmorégulateur (**Hadi et al., 2008**). *D. salina* est une chlorophycée très proche des plantes terrestres et pourra être un bon modèle pour étudier la réponse des plantes au stress salin (**Cowan et al., 1992; Katz et al., 2007; Ramos et al., 2011**). A part leur intérêt scientifique comme espèce modèle pour étudier l'effet du stress salin sur la physiologie et la biochimie des plantes, *D. salina* est une source de molécules bioactives très importantes, et vu sa diversité biochimique, cette microalgue est largement étudiée. Il a été démontré que cette microalgue a un pouvoir antioxydant très important (**Anila et al., 2016; Cho et al., 2016; Singh et al., 2016; EL-Baky et al., 2004; Murthy et al., 2005; Herrero et al., 2006**). Dans ce sens, les extraits de *D. salina* cultivée dans des salinités élevées ont montré un effet d'atténuation de l'effet du stress salin sur les plantes de maïs cultivées dans des conditions de stress salin (**Essa et al., 2013**).

Dans notre étude, le résultat du traitement des plantes étudiées par les extraits de *D. salina* cultivée dans des salinités élevées a montré un effet d'atténuation de l'effet du stress salin sur la germination et la croissance des plantes. Une stimulation de la vitesse et du pourcentage de la germination a été obtenue pour le traitement des graines du blé, poivron et la tomate par les différents types d'extraits de *D. salina*. Les exopolysaccharides libérés dans le milieu de culture par cette microalgue en réponse au stress salin, ont montré l'effet majoritaire de la stimulation

de la germination des graines (une amélioration du taux de la germination des graines du blé germées dans 3g/L et 6g/L de NaCl avec 97,5 et 105,7% respectivement par rapport aux graines stressées non traitées par les exopolysaccharides). La croissance des plantes étudiées tel que le blé, a subi une amélioration de la taille de la partie aérienne et racinaire avec 31,7% et 70% respectivement par rapport aux plantes non traitées, et a permis également l'induction de la biosynthèse des osmolytes telle que la proline, ainsi que la régulation de l'activité des enzymes antioxydantes chez les plantes sous stress salin telles que les enzymes (POD, APX, SOD et CAT).

L'adaptation et la tolérance des plantes à la présence de sel dans le sol et au stress salin implique des processus très variés intervenant à différents niveaux, de la cellule à l'organisme entier, comme par exemple une modification de l'activité métabolique conduisant à l'accumulation des osmolytes organiques (**Ghars et al., 2008; Lopez-Carrion et al., 2008**). Plusieurs études ont montré que les extraits d'algues ont un effet sur l'atténuation de l'effet du stress salin sur la germination et la croissance des plantes, telle que l'étude de **Ghareib et al., (2010)** qui a montré que l'extrait de *Sargassum virgatum* a un effet sur la stimulation de la germination de la tomate (**Ghareib et al., 2010**). Dans le même sens, l'extrait de *Ascophyllum nodosum* a accéléré la germination des graines de la tomate (**Basher et al., 2012**). Une autre algue, *Ulva rigida* a améliorée le potentiel du mécanisme antioxydatif et stimulant de la croissance du blé dans les conditions du stress salin (**Chernaneetal., 2015**). Concernant les microalgues, l'étude de **El-Baky et al., 2010** a montré que les extraits de *Spirulina maxima* et *Chlorella ellipsoïda* ont un effet de stimulation du mécanisme antioxydant, de la germination et de la croissance des plantes du blé cultivées dans des conditions du stress salin, ce qui argumente le résultat obtenu dans notre étude (**El-Baky et al., 2010**). Les exopolysaccharides ont un effet d'atténuation de l'effet du stress salin sur la germination et la croissance des plantes et ont permis la régulation de l'assimilation du sodium et la stimulation de la croissance des plantes de blé cultivées dans des sols salin (**Arorra et al., 2010; Ashraf et al., 2004**).

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Répondant à une des stratégies nationales actuelles, à savoir la valorisation des ressources naturelles renouvelables, l'amélioration de l'agriculture durable et le développement des produits biologiques efficaces. Les travaux présentés dans ce manuscrit ont eu pour objectif d'étudier les voies physiologiques et biochimiques des microalgues Marocaines, grâce à une optimisation des conditions de culture, la caractérisation chimique et biochimique, et la valorisation du potentiel chimique et biochimique de ces microalgues pour la stimulation de la germination et la croissance des plantes, ainsi l'atténuation de l'effet du stress salin sur les différentes phases de la croissance de la plante. Pour cela, une optimisation des conditions de culture des différentes souches de microalgues choisies pour ce projet, tels que le milieu de culture, la température et le pourcentage du CO₂ dans la culture. Cette étape a été suivie par une caractérisation chimique et biochimique des souches étudiées. Les résultats obtenus ont montré un potentiel très important pour la valorisation de ces microalgues dans le domaine de la stimulation et la protection des plantes contre les stress biotiques et abiotiques. Un criblage de différentes espèces de microalgues a été réalisé pour leurs effets de stimulation de la germination et la croissance des plantes. Ce criblage a permis la détermination de deux souches ayant un effet de stimulation de la germination et la croissance de la tomate. L'étude de l'effet de différentes fractions de la biomasse des deux souches retenues lors du premier criblage, a montré que les polysaccharides avaient le meilleur effet de stimulation de la germination et la croissance de la tomate.

Dans le but d'approfondir l'étude, le spectre des plantes étudiées a été élargi pour l'évaluation de l'effet de ces polysaccharides sur la stimulation de la germination et la croissance. Pour cela, nous avons étudié leur effet sur le blé et le poivron, le résultat relatif à la germination et la croissance a été similaire à celui obtenu avec la tomate.

Dunaliella salina, une des deux souches retenues après l'étude de criblage a été étudiée dans ce projet en tant qu'une espèce modèle des chlorophycées qui est très proche des plantes terrestres pour la compréhension de leur tolérance au stress salin d'une part, et d'autre part, la valorisation du potentiel biochimique de cette souche halophile, pour l'atténuation de l'effet du stress salin sur les différentes phases de la plante. L'étude de la croissance de cette souche dans des conditions de salinités élevées a montré que cette souche tolère la salinité sans aucune influence nefaste sur leur croissance. L'étude biochimique de cette souche dans les conditions du stress salin a montré une accumulation de quelques molécules considérées comme osmorégulateurs telles que la proline et les caroténoïdes et une libération des

exopolysaccharides dans le milieu de culture pour la régulation de leur pression osmotique. L'étude de l'effet de ces molécules produites par cette souche permettant aux plantes de tolérer le stress salin a montré que les exopolysaccharides induisaient une stimulation de la germination des graines de blé, tomate et poivron. Cet effet apparait sur tous les paramètres physiologiques, biochimiques et enzymatiques des plantes traitées par les exopolysaccharides tels que la croissance, le taux de proline, de chlorophylle, de l'anthocyanine et des enzymes liées aux stress (ROS-Scavenging enzymes). Ainsi l'étude métabolomique des plantes de tomate cultivées dans les conditions de stress salin et traitées par les exopolysaccharides extraits de *D. salina*, a montré que ces molécules ont induit la stimulation des différentes voies métaboliques de la tolérance des plantes au stress salin.

Les exopolysaccharides des microalgues présentent un fort potentiel comme source renouvelable pour le développement des produits de stimulation de la germination, la croissance et la protection des plantes.

La production de ces exopolysaccharides, en quantité et qualité par les microalgues, pourrait jouer un rôle primordial dans le domaine de la stimulation et la protection des plantes et l'amélioration du rendement de l'agriculture tout en respectant l'environnement. Au cours de cette étude, les exopolysaccharides ont été récupérés des microalgues cultivées dans des conditions classiques ne favorisant pas la surproduction de ses exopolymères. Pourtant, des études d'optimisation des conditions qui pourraient orienter la culture de microalgues vers la surproduction de ces exopolysaccharides, ainsi que des études pour le développement des procédés et des solutions à faible coût pour la récolte de ces exopolysaccharides pourraient être une solution très prometteuse pour une agriculture durable et efficace.

L'étude des voies de la biosynthèse des exopolysaccharides par les microalgues, ouvre de nouvelles perspectives et toutes les possibilités de l'amélioration biotechnologique et/ou génétique de la production de ces macromolécules, ainsi elle permettra la maîtrise de la stabilité structurelle et fonctionnelle de ces molécules.

L'étude des mécanismes d'action de ces molécules sur la stimulation de la germination et la croissance, ainsi que la tolérance des plantes au stress salin, permettra la compréhension et l'amélioration de l'effet de ces molécules. Ce qui donnera la possibilité de proposer des modes d'utilisation avec plus de précision, d'efficacité et de spécificité.

D'autres voies de valorisation de ces exopolysaccharides dans le domaine de l'amélioration et la protection des plantes devraient être menées tels que l'effet de ces molécules sur la

stimulation de l'assimilation et l'absorption des nutriments par la plante, l'effet éliciteur de la défense naturelle des plantes, ainsi que l'effet de ces molécules sur la qualité morphologique et biochimique des fruits.

Références Bibliographiques**A**

Abouabdellaha, R., Bennouna, A., Attar, J. E., Eler, K., Dellal, M., & Moukrim, A. (2011). Diarrhetic shellfish poisoning toxin profile of shellfish from Southern Atlantic coasts of Morocco. *South Asian Journal of Experimental Biology*, 1(2), 101-106.

Abreu, I., Reguera, M., Bonilla, A., Bolaños, L., & Bonilla, I. (2016). Mineral Nutrition in the Legume-Rhizobia Nitrogen Fixing Symbiosis. *Beneficial Plant-microbial Interactions: Ecology and Applications*, 122.

Abomohra, A. E. F., El-Sheekh, M., & Hanelt, D. (2017). Screening of marine microalgae isolated from the hypersaline Bardawil lagoon for biodiesel feedstock. *Renewable Energy*, 101, 1266-1272.

Acosta-Motos, J. R., Ortuño, M. F., Bernal-Vicente, A., Diaz-Vivancos, P., Sanchez-Blanco, M. J., & Hernandez, J. A. (2017). Plant Responses to Salt Stress: Adaptive Mechanisms. *Agronomy*, 7(1), 18.

Adam, A., Arabi, M. I. E., Idris, I., & Al-Shehadah, E. (2017). Effect of several rhizobacteria strains on barley resistance against *Pyrenophora graminea* under field conditions. *Hellenic Plant Protection Journal*, 10(1), 35-45.

Adam P. (1990) Salt marsh ecology. Cambridge University Press, Cambridge, UK. Almansouri M., Kinet J-M. & Lutts S. 2001 Effect of salt and osmotic stresses on germination in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Plant and Soil* 231, 243–254

Aghofack-Nguemezi, J., Schinzoumka, P. A., & Tatchago, V. (2015). Effects of extracts or powder of *Jatropha curcas* and *Spirulina platensis* on the growth and development of tomato plant. *Journal of Applied Biosciences*, 90, 8413-8420.

Ahmad, S., Imran, M., Hussain, S., Mahmood, S., Hussain, A., & Hasnain, M. (2017). Bacterial impregnation of mineral fertilizers improves yield and nutrient use efficiency of wheat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.

Ahmad P, Jeleel CA, Azooz MM, Nabi G (2009) Generation of ROS and non-enzymatic antioxidants during abiotic stress in Plants. *Bot Res Intern* 2:11–20

- Ahmad P, Jaleel CA, Salem MA, Nabi G, Sharma S (2010a) Roles of Enzymatic and non-enzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Crit Rev Biotechnol* 30(3):161–175
- Ahmad P, Jaleel CA, Sharma S (2010b) Antioxidative defence system, lipid peroxidation, proline metabolizing enzymes and Biochemical activity in two genotypes of *Morus alba* L. subjected to NaCl stress. *Russ J Plant Physiol* 57:509–517
- Ahmadi, A., Moghadamtousi, S. Z., Abubakar, S., and Zandi, K. (2015). Antiviral potential of algae polysaccharides isolated from marine sources: a review. *Biomed. Res. Int.* 41, 42. doi: 10.1155/2015/825203
- AKALLAL, R., BILLARD, C., FRESNEL, J., GIVERNAUD, T., & MOURADI, A. (2002). Contribution à l'étude du phytoplancton de la côte atlantique marocaine. II. Le genre *Pseudonitzschia* (Bacillariophyceae). *Cryptogamie. Algologie*, 23(2), 187-202.
- Aloui, H., Souguir, M., Latique, S., & Hannachi, C. (2014). Germination and growth in control and primed seeds of pepper as affected by salt stress. *Cercetari Agronomice in Moldova*, 47(3), 83-95.
- Alcaine, A.A. Biodiesel from microalgae. Final degree project. Royal School of Technology Kungliga TekniskaHögskolan, Stockholm, Sweden. 2010.
- Alhasnawi, A. N., Zain, C. R., Kadhimi, A. A., Isahak, A., Mohamad, A., & Yusoff, W. M. W. (2017). Accumulation of antioxidants in rice callus (*Oryza sativa* L.) induced by β -glucan and salt stress. *Australian Journal of Crop Science*, 11(1), 118-125.
- Al-Karaki, G. N., Hammad, R., & Rusan, M. (2001). Response of two tomato cultivars differing in salt tolerance to inoculation with mycorrhizal fungi under salt stress. *Mycorrhiza*, 11(1), 43-47.
- Aly M. S.1 and Mona A. Esawy (2008) Evaluation of *Spirulina Platensis* as Bio.Stimulator for Organic Farming Systems *JGEB* Vol. 6, No. 1, 2008.
- Amine, H., Benomar, Y., Haimeur, A., Messaouri, H., Meskini, N., & Taouis, M. (2016). *Odontella aurita*-enriched diet prevents high fat diet-induced liver insulin resistance. *Journal of Endocrinology*, 228(1), 1-12.

Amine, H., Benomar, Y., Meskini, N., & Taouis, M. (2014). *Odontella aurita*-enriched high-fat diet prevents high-fat diet induced insulin resistance. In *Insulin and Endocrine Metabolic Action* (pp. SUN-1052). Endocrine Society.

AMIRA H, GHONAME A,NAFEH A.,2014. Alleviation of Salt Stress Adverse Effect and Enhancing Phenolic Anti-oxidant Content of Eggplant by Seaweed Extract March 2015, *Gesunde Pflanzen* Volume 67, Issue 1, pp 21-31

Amirkhani, M., Netravali, A. N., Huang, W., & Taylor, A. G. (2016). Investigation of Soy Protein-based Biostimulant Seed Coating for Broccoli Seedling and Plant Growth Enhancement. *HortScience*, 51(9), 1121-1126.

Anderson, G., 2009. Seaweed extract shows improved fruit quality at McLaren Vale vineyard trial. *Aust. N. Z. Grapegrow. Winemak.* 548, 17–22

Andersen R.A., 1992. Diversity of eukaryotic algae. *Biodiversity and Conservation*, 1(4), 267–292.

Anitha. L, P. Kalpana and G. Sai Bramari. 2016. Evaluation of *Spirulina platensis* as microbial inoculants to enhanced protein levels in *Amaranthus gangeticus*. *African Journal of Agricultural Research*. Vol. 11(15), pp. 1353-1360, 14 April, 2016

Anila, N., Simon, D. P., Chandrashekar, A., Ravishankar, G. A., & Sarada, R. (2016). Metabolic engineering of *Dunaliella salina* for production of ketocarotenoids. *Photosynthesis research*, 127(3), 321-333.

Araujo, O. Q. F., Gobbi, C. N., Chaloub, R. M., & Coelho, M. A. Z. (2009). Assessment of the impact of salinity and irradiance on the combined carbondioxide sequestration and carotenoids production by *Dunaliella salina*: a mathematical model. *Biotechnology and bioengineering*, 102(2), 425-435.

Arbona, V., Manzi, M., Zandalinas, S. I., Vives-Peris, V., Pérez-Clemente, R. M., & Gómez-Cadenas, A. (2017). Physiological, Metabolic, and Molecular Responses of Plants to Abiotic Stress. In *Stress Signaling in Plants: Genomics and Proteomics Perspective*, Volume 2 (pp. 1-35). Springer International Publishing.

Arora, M., Kaushik, A., Rani, N., & Kaushik, C. P. (2010). Effect of cyanobacterial exopolysaccharides on salt stress alleviation and seed germination.

Ashokkumar, V., Agila, E., Sivakumar, P., Salam, Z., Rengasamy, R., & Ani, F. N. (2014). Optimization and characterization of biodiesel production from microalgae *Botryococcus* grown at semi-continuous system. *Energy Conversion and Management*, 88, 936-946.

Ashraf, M., Hasnain, S., & Berge, O. (2006). Effect of exo-polysaccharides producing bacterial inoculation on growth of roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) plants grown in a salt-affected soil. *International Journal of Environmental Science & Technology*, 3(1), 43-51.

Ashraf, M., Hasnain, S., Berge, O., & Mahmood, T. (2004). Inoculating wheat seedlings with exopolysaccharide-producing bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt stress. *Biology and Fertility of Soils*, 40(3), 157-162.

Avila, J., G. Brooks, A. G. Day, A. Somanchi, and A. Coragliotti. 2012. Compositions for improving the health and appearance of skin, Patent no. US8298548 B2.

Awasthi R, Kaushal N, Vadez V, Turner NC, Berger J, Siddique KHM, Nayyar H (2014) Individual and combined effects of transient drought and heat stress on carbon assimilation and seed filling in chickpea. *Funct Plant Biol* 41: 1148–1167

Azevedo, R.A., Lea, P.J., 2011. Research on abiotic and biotic stress—what next? *Ann. Appl. Biol.* 159, 317–319.

B

Bach L. et al. 2011. Very-long-chain fatty acids are required for cell plate formation during cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of cell science* 124:3223.

Bafana, A. (2013). Characterization and optimization of production of exopolysaccharide from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Carbohydrate polymers*, 95(2), 746-752.

Balduyck, L., Bijttebier, S., Bruneel, C., Jacobs, G., Voorspoels, S., Muylaert, K., & Foubert, I. (2016). Lipolytic stability during wet storage of autotrophic microalgae.

Barnawal, D., Pandey, S. S., Bharti, N., Pandey, A., Ray, T., Singh, S., ...& Kalra, A. (2017). ACC deaminase-containing plant growth promoting rhizobacteria protect *Papaver somniferum* from downy mildew. *Journal of Applied Microbiology*.

- Barba-Espín, G., Clemente, Moreno, M. J., Alvarez, S., García-Legaz, M. F., Hernandez, J. A., & Díaz-Vivancos, P. (2011). Salicylic acid negatively affects the response to salt stress in pea plants. *Plant Biology*, 13(6), 909-917.
- Battacharyya, D., Babgohari, M. Z., Rathor, P., & Prithviraj, B. (2015). Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 39-48.
- Belhaj, D., Athmouni, K., Frikha, D., Kallel, M., El Feki, A., Maalej, S., ...& Ayadi, H. (2017). Biochemical and physiological responses of halophilic nanophytoplankton (*Dunaliella salina*) from exposure to xeno-estrogen 17 α -ethinylestradiol. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-11.
- Benavides MP, PL Marconi, SM Gallego, ME Comba and ML Tomaro. 2000. Relationship between antioxidant defence systems and salt tolerance in *Solanum tuberosum*. *Aust J Plant Physiol* 27:273-278.
- Bennouna, A., Assobhei, O., Berland, B., & El Attar, J. (2000). Étude des populations phytoplanctoniques de la lagune de Oualidia (Maroc); dinoflagellés potentiellement nuisibles. *Mar. Life*, 10(1-2), 3-18.
- Becker, E. W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology advances*, 25(2), 207-210.
- Berlyn GP, Russo RO. 1990. The use of organic biostimulants to promote root growth. *Belowground Ecol.* 2:12–13.
- Bhakta, J. N., Lahiri, S., Pittman, J. K., & Jana, B. B. (2015). Carbon dioxide sequestration in wastewater by a consortium of elevated carbon dioxide-tolerant microalgae. *Journal of CO2 Utilization*, 10, 105-112.
- Bi, F., Iqbal, S., Arman, M., Ali, A., & Hassan, M. U. (2011). Carrageenan as an elicitor of induced secondary metabolites and its effects on various growth characters of chickpea and maize plants. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15(3), 269-273.
- Bibi, R., Ahmad, Z., Imran, M., Hussain, S., Ditta, A., Mahmood, S., & Khalid, A. (2016). Algal bioethanol production technology: A trend towards sustainable development. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*.
- Biller, P, A.B. Ross, *Bioresource Technology*, 2011, 102, 215-225

Blunden, G. (1991). Agricultural uses of seaweeds and seaweed extracts. *Seaweed resources in Europe: uses and potential*, 65-81.

Bourke, M. F., Marriott, P. J., Glud, R. N., Hasler-Sheetal, H., Kamalanathan, M., Beardall, J., ... & Cook, P. L. (2017). Metabolism in anoxic permeable sediments is dominated by eukaryotic dark fermentation. *Nature Geoscience*, 10(1), 30-35.

Borowitzka, M. A. (2013). High-value products from microalgae—their development and commercialisation. *J. Appl. Phycol.* 25, 743–756. doi: 10.1007/s10811-013-9983-9

Borowitzka M. A. 1990. The mass culture of *Dunaliella salina*. Technical Resource Papers Regional Workshop on the Culture and Utilization of Seaweeds. Volume II. Regional Seafarming Development and Demonstration Project RAS/90/002. 27-31 August, Cebu City, Philippines.

Bourdenx, B., Bernard, A., Domergue, F., Pascal, S., Léger, A., Roby, D., ... & Lessire, R. (2011). Overexpression of *Arabidopsis ECERIFERUM1* promotes wax very-long-chain alkane biosynthesis and influences plant response to biotic and abiotic stresses. *Plant physiology*, 156(1), 29-45.

Bulgari, R., Cocetta, G., Trivellini, A., Vernieri, P., & Ferrante, A. (2015). Biostimulants and crop responses: a review. *Biological Agriculture & Horticulture*, 31(1), 1-17.

Borowitzka LJ, Borowitzka MA. 1990 Commercial production of B-carotene by *D. salina* in open ponds. *Bull. Mar. Sci* 47, 1, pp.244-252(9)

C

Calvo, P., Nelson, L., Kloepper, J.W., 2014. Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant Soil* 383, 3–41.

Canellas, L. P., Olivares, F. L., Aguiar, N. O., Jones, D. L., Nebbioso, A., Mazzei, P., & Piccolo, A. (2015). Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 15-27.

Carlsson, A. S. (Ed.). (2007). *Micro-and macro-algae: utility for industrial applications: outputs from the EPOBIO project*. CPL Press.

- Campo, V. L., Kawano, D. F., da Silva Jr, D. B., and Carvalho, I. (2009). Carrageenans: biological properties, chemical modifications and structural analysis – a review. *Carbohydr. Polym.* 77, 167–180. doi: 10.1016/j.carbpol.2009.01.020.
- Castro, J., Vera, J., González, A., and Moenne, A. (2012). Oligo-carrageenans stimulate growth by enhancing photosynthesis, basal metabolism, and cell cycle in tobacco plants (var. Burley). *J. Plant Growth Regul.* 31, 173–185. doi: 10.1007/s00344-011-9229-5
- Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., Triratana, P., Loha, V., Tia, S., & Bunnag, B. (2013). Polysaccharide extraction from *Spirulina* sp. and its antioxidant capacity. *International journal of biological macromolecules*, 58, 73-78.
- Chang, H. X., Fu, Q., Huang, Y., Xia, A., Liao, Q., Zhu, X., ... & Sun, C. H. (2016). An annular photobioreactor with ion-exchange-membrane for non-touch microalgae cultivation with wastewater. *Bioresource Technology*, 219, 668-676.
- Cheah, W. Y., Ling, T. C., Show, P. L., Juan, J. C., Chang, J. S., & Lee, D. J. (2016). Cultivation in wastewaters for energy: A microalgae platform. *Applied Energy*, 179, 609-625.
- Cheeseman JM (1988) Mechanism of salinity tolerance in plants. *Plant Physiol* 87:547–550
- Chen, R., Jin, C., Tong, Z., Lu, J., Tan, L., Tian, L., & Chang, Q. (2016). Optimization extraction, characterization and antioxidant activities of pectic polysaccharide from tangerine peels. *Carbohydrate polymers*, 136, 187-197.
- Chen L, Yu X, and Zhang W. (2015) Chemicals to enhance microalgal growth and accumulation of high-value bioproducts. *Front Microbiol.*; 6: 56
- Chen Chun-Yen, Pei-Chun Kao, Chia-Jung Tsai, Duu-Jong Lee, Jo-Shu Chang. 2013. Engineering strategies for simultaneous enhancement of C-phycoerythrin production and CO₂ fixation with *Spirulina platensis*, *Bioresource Technology*
- Chen S.Y, Li-Ying PAN, Min-Jhe HONG, and An-Chin LEE. 2012. The effects of temperature on the growth of and ammonia uptake by marine microalgae. *Botanical Studies* 53: 125-133
- Chen Y.C. 2011. The effect of shifts in medium types on the growth and morphology of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*). *Journal of Marine Science and Technology*, Vol. 19, No. 5, pp. 565-570

Chen, H., & Jiang, J. G. (2009). Osmotic responses of *Dunaliella* to the changes of salinity. *Journal of cellular physiology*, 219(2), 251-258.

Chen, Y., C.E. Clapp & H. Magen. 2004. Mechanisms of plant growth stimulation by humic substances: The role of organo-iron complexes. *Soil Science and Plant Nutrition*, 50:7, 1089-1095.

Chernova, N. I., & Kiseleva, S. V. (2017). Microalgae biofuels: Induction of lipid synthesis for biodiesel production and biomass residues into hydrogen conversion. *International Journal of Hydrogen Energy*.

Cheong, M. S., & Yun, D. J. (2007). Salt-stress signaling. *Journal of Plant Biology*, 50(2), 148-155.

Chernane H, Latique S, Mansori M, El Kaoua M. (2015) Salt stress tolerance and antioxidative mechanisms in wheat plants (*Triticum durum* L.) by seaweed extracts application. *Journal of Agriculture and Veterinary Science*. 2319-2372. 8, 3, PP 36-44.

Choi, S. J., Kim, J. K., Kim, H. K., Harris, K., Kim, C. J., Park, G. G., ... & Shin, D. H. (2013). 2, 4-Di-tert-butylphenol from sweet potato protects against oxidative stress in PC12 cells and in mice. *Journal of medicinal food*, 16(11), 977-983.

Chiu, P. H., Soong, K., & Chen, C. N. N. (2016). Cultivation of two thermotolerant microalgae under tropical conditions: Influences of carbon sources and light duration on biomass and lutein productivity in four seasons. *Bioresource technology*, 212, 190-198.

Cho, K., Lee, C. H., Ko, K., Lee, Y. J., Kim, K. N., Kim, M. K., ... & Oda, T. (2016). Use of phenol-induced oxidative stress acclimation to stimulate cell growth and biodiesel production by the oceanic microalga *Dunaliella salina*. *Algal Research*, 17, 61-66.

Choi W.-Y., S.-H. Oh, C.-G. Lee, Y.-C. Seo, C.-H. Song, J.-S. Kim, and H.-Y. Lee. 2012. Enhancement of the Growth of Marine Microalga *Chlorella* sp. from Mixotrophic Perfusion Cultivation for Biodiesel Production. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 26 (3) 207–216

Chojak-Koźniewska, J., Linkiewicz, A., Sowa, S., Radzioch, M. A., & Kuźniak, E. (2017). Interactive effects of salt stress and *Pseudomonas syringae* pv *lachrymans* infection in cucumber: Involvement of antioxidant enzymes, abscisic acid and salicylic acid. *Environmental and Experimental Botany*.

- Chojnacka, K., Saeid, A., & Michalak, I. (2012). The possibilities of the application of algal biomass in the agriculture. *Chemik*, 66, 1235-1248.
- Chokshi, K., Pancha, I., Ghosh, A., & Mishra, S. (2017). Nitrogen starvation-induced cellular crosstalk of ROS-scavenging antioxidants and phytohormone enhanced the biofuel potential of green microalga *Acutodesmus dimorphus*. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 60.
- Cohen AC, Travaglia CN, Bottini R, Piccoli PN. 2009. Participation of abscisic acid and gibberellins produced by endophytic *Azospirillum* in the alleviation of drought effects in maize. *Botanique* 87: 455-462.
- Coragliotti, A., S. Franklin, A. G. Day, and S. M. Decker. 2010. Microalgal polysaccharide compositions, Patent no. WO2010111710 A1
- Cortés-Jiménez, D., Gómez-Guzmán, A., Iturriaga, G., Suárez, R., Montero Alpírez, G., & ME Escalante, F. (2014). Microorganisms associated to tomato seedlings growing in saline culture act as osmoprotectant. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(2), 613-620.
- Courtois, J. (2009). Oligosaccharides from land plants and algae: production and applications in therapeutics and biotechnology. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 261–273. doi: 10.1016/j.mib.2009.04.007
- Coustets, M., Joubert-Durigneux, V., Hérault, J., Schoefs, B., Blanckaert, V., Garnier, J. P., & Teissié, J. (2015). Optimization of protein electroextraction from microalgae by a flow process. *Bioelectrochemistry*, 103, 74-81.
- Cowan, A. K., Rose, P. D., & Horne, L. G. (1992). *Dunaliella salina*: a model system for studying the response of plant cells to stress. *Journal of experimental botany*, 43(12), 1535-1547.
- Colla, G., Roupael, Y., Canaguier, R., Svecova, E., & Cardarelli, M. (2014). Biostimulant action of a plant-derived protein hydrolysate produced through enzymatic hydrolysis. *Front. Plant Sci*, 5(448), 10-3389.
- Conte P, Piccolo A (1999) Conformational arrangement of dissolved humic substances. Influence of solution composition on association of humic molecules. *Environmental Science and Technology* 33: 1682-1690.

CLUNIES-ROSST. ET HILDYARDN., 1992. The Politics of Industrial Agriculture. Earthscan Publications Ltd, London, 167 p.

Cray, J. A., Bell, A. N., Bhaganna, P., Mswaka, A. Y., Timson, D. J., & Hallsworth, J. E. (2013). The biology of habitat dominance; can microbes behave as weeds?. *Microbialbiotechnology*, 6(5), 453-492.

Christaki, E., Bonos, E., & Florou-Paneri, P. (2015). Innovative microalgae pigments as functional ingredients in nutrition. *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*. Elsevier Academic Press, London, UK, 233-243.

Cvetkovic, D., Fiedor, L., Fiedor, J., Wiśniewska-Becker, A., & Markovic, D. (2013). Molecular Base for Carotenoids Antioxidant Activity in Model and Biological Systems: The Health-Related Effects. *Carotenoids: Food Sources, Production and Health Benefits*, 93-126.

D

Da Silva Vaz, B., Moreira, J. B., de Moraes, M. G., & Costa, J. A. V. (2016). Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements. *Current Opinion in Food Science*, 7, 73-77.

Daoudi, M., Serve, L., Rharbi, N., El Madani, F., & Vouvé, F. (2013). Phytoplankton distribution in the Nador lagoon (Morocco) and possible risks for harmful algal blooms. *Transitional Waters Bulletin*, 6(1), 4-19.

Danesh, A. F., Ebrahimi, S., Salehi, A., & Parsa, A. (2017). Impact of Nutrient Starvation on Intracellular Biochemicals and Calorific Value of Mixed Microalgae. *Biochemical Engineering Journal*.

Dayananda, C., Sarada, R., Rani, M. U., Shamala, T. R., & Ravishankar, G. A. (2007). Autotrophic cultivation of *Botryococcus braunii* for the production of hydrocarbons and exopolysaccharides in various media. *Biomass and Bioenergy*, 31(1), 87-93.

de Jesus Raposo, M. F., de Moraes, A. M. B., and de Moraes, R. M. S. C. (2015). Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications. *Mar. Drugs* 13, 2967–3028. doi: 10.3390/md13052967

de Jesus Raposo, M. F., de Morais, A. M. M. B., & de Morais, R. M. S. C. (2014). Influence of sulphate on the composition and antibacterial and antiviral properties of the exopolysaccharide from *Porphyridium cruentum*. *Life sciences*, 101(1), 56-63.

de Jesus Raposo, M. F., De Morais, R. M. S. C., and De Morais, A. M. M. B. (2013). Bioactivity and applications of sulphated polysaccharides from marine microalgae. *Mar. Drugs* 11, 233–252. doi: 10.3390/md11010233

de Mooij, T., Nejad, Z. R., van Buren, L., Wijffels, R. H., & Janssen, M. (2017). Effect of photoacclimation on microalgae mass culture productivity. *Algal Research*, 22, 56-67.

Demir, N., Dural, B., & Yildirim, K. (2006). Effect of seaweed suspensions on seed germination of tomato, pepper and aubergine. *J Biol Sci*, 6(6), 1130-1133.

Devi, N., Sarmah, M., Khatun, B., & Maji, T. K. (2016). Encapsulation of active ingredients in polysaccharide–protein complex coacervates. *Advances in colloid and interface science*.

Dillon, H. F., A. Somanchi, K. Rao, and P. J. H. Jones. 2007. Nutraceutical compositions from microalgae and related methods of production and administration, Patent no. WO2007136428 A2.

Dmytryk, A., Michalak, I., Wilk, R., Chojnacka, K., Górecka, H., & Górecki, H. (2015). Innovative seed treatment with algae homogenate. *Waste and Biomass Valorization*, 6(4), 441-448.

Dodgson KS (1961). Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and nonenzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. *Biochem. J.* 78:312-319.

DOUCETR, 1992. *La Science Agricole: Climat, Sol et Productions Végétales du Québec*. Éditions Berger, Québec, 699 p

Durand, N., Briand, X. & Meyer, C., 2003. The effect of marine bioactive substances (N PRO) and exogenous cytokinins on nitrate reductase activity in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, 119(4).

Dursun A, Turkmen O, Turan M, Erdinc C. 2014 Calcium and Humic Acid Affect Seed Germination, Growth, and Nutrient Content of Tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) Seedlings under Saline Soil Conditions. *Acta Agriculturae Scandinavica*. 37-41

E

El Arroussi, H., Elbaouchi, A., Benhima, R., Bendaou, N., Smouni, A., & Wahby, I. (2015, November). Halophilic microalgae *Dunaliella salina* extracts improve seed germination and seedling growth of *Triticum aestivum* L. under salt stress. In II World Congress on the Use of Biostimulants in Agriculture 1148 (pp. 13-26).

Ejike, C. E., Collins, S. A., Balasuriya, N., Swanson, A. K., Mason, B., & Udenigwe, C. C. (2016). Prospects of microalgae proteins in producing peptide-based functional foods for promoting cardiovascular health. *Trends in Food Science & Technology*.

El-Baky, H. H., El-Baz, F. K., & El Baroty, G. S. (2010). Enhancing antioxidant availability in wheat grains from plants grown under seawater stress in response to microalgae extract treatments. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(2), 299-303.

El-Baky, H. H. A., Hussein, M. M., & El-Baroty, G. S. (2008). Algal extracts improve antioxidant defense abilities and salt tolerance of wheat plant irrigated with sea water. *African Journal of Biochemistry Research*, 2(7), 151-164.

El-Din, S. M. M. (2015). UTILIZATION OF SEAWEED EXTRACTS AS BIO-FERTILIZERS TO STIMULATE THE GROWTH OF WHEAT SEEDLINGS. *THE EGYPTIAN JOURNAL OF EXPERIMENTAL BIOLOGY (Botany)*, 11(1), 31-39.

Elmadani, F., Chiaar, A., & Chafi, A. (2011). Phytoplankton composition and abundance assessment in the Nador lagoon (Mediterranean coast of Morocco).

El Modafar, C., Elgadda, M., El Boutachfai, R., Abouraicha, E., Zehhar, N., Petit, E., ... & Courtois, J. (2012). Induction of natural defence accompanied by salicylic acid-dependant systemic acquired resistance in tomato seedlings in response to bioelicitors isolated from green algae. *Scientia Horticulturae*, 138, 55-63.

Elstner EF (1987) Metabolism of activated oxygen species. In: Davies DD (ed) *The biochemistry of plants, vol II, Biochemistry of metabolism*. Academic, San Diego, pp 252–315

Elumalai S., G. Jegan G. K. Saravanan T. Sangeetha and D. Roop singh. (2014). Studies on Growth and Biochemical Analysis of Three Microalgal Strains on Different Molar Concentration of Sodium Bicarbonate. *INDIAN JOURNAL OF APPLIED RESEARCH*. Volume : 4 | Issue : 1. 60-62

ERVINE.RUNGECF., G m mE.A., ANTHONYWE, BATIES.S., FAETHP., PENNYT, ET WARMANT., 1998. Agriculture and the environment: a new strategic vision. *Environment*, vol. 40(6), pp. 8-15.

Ertani, A., Schiavon, M., Muscolo, A., & Nardi, S. (2013). Alfalfa plant-derived biostimulant stimulates short-term growth of salt-stressed *Zea mays* L. plants. *Plant and Soil*, 364(1-2), 145-158.

Ertani, A., Cavani, L., Pizzeghello, D., Brandellero, E., Altissimo, A., Ciavatta, C., & Nardi, S. (2009). Biostimulant activity of two protein hydrolyzates in the growth and nitrogen metabolism of maize seedlings. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 172(2), 237-244.

Ertani, A.; Francioso, O.; Tugnoli, V.; Righi, V.; Nardi, S. 2011. Effect of commercial Lignosulfonate-Humate on *Zea mays* L. metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 11940-11948. [Links]

Ertani, A.; Schiavon, M.; Altissimo, A.; Franceschi, A.; Nardi, S. 2011b. Phenol-containing organic substances stimulate phenylpropanoid metabolism in *Zea mays*. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 174: 496-503. [Links]

Ertani, A.; Nardi, S.; Altissimo, A. 2013. Long-term research activity on the biostimulant properties of natural origin compounds. *Acta Horticulture* 1009: 181-188.

Escalante, F. M., Cortés-Jiménez, D., Tapia-Reyes, G., & Suárez, R. (2015). Immobilized microalgae and bacteria improve salt tolerance of tomato seedlings grown hydroponically. *Journal of Applied Phycology*, 27(5), 1923-1933.

Essa, A. M., Ali, R. M., & Ali, B. E. (2013). Alleviation of salinity stress on maize plants using extract of the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. *Asian Journal of Biological and Life Science*, 2(2), 134-141.

Eyras, M. C., Defosse, G. E., & Dellatorre, F. (2008). Seaweed compost as an amendment for horticultural soils in Patagonia, Argentina. *Compost science & utilization*, 16(2), 119-124.

F

Fachet, M., Hermsdorf, D., Rihko-Struckmann, L., & Sundmacher, K. (2016). Flow cytometry enables dynamic tracking of algal stress response: A case study using carotenogenesis in *Dunaliella salina*. *Algal Research*, 13, 227-234.

Fan, J., Feng, H., Yu, Y., Sun, M., Liu, Y., Li, T., ...& Sun, M. (2017). Antioxidant activities of the polysaccharides of *Chuanminshen violaceum*. *Carbohydrate Polymers*, 157, 629-636.

FAN D., 2011. *Ascophyllum nodosum* extracts improve shelf life and nutritional quality of spinach (*Spinacia oleracea* L.). Dissertation, Dalhousie University

Farhangi-Abriz, S., & Torabian, S. (2017). Antioxidant enzyme and osmotic adjustment changes in bean seedlings as affected by biochar under salt stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 137, 64-70.

Fiedor J., Fiedor L., Haessner R. & Scheer H. 2005 Cyclic endoperoxides of β -carotene, potential pro-oxidants, as products of chemical quenching of singlet oxygen. *Biochim. Biophys. Acta* 1709, 1-4.

Foolad, M. R., Subbiah, P., & Zhang, L. (2008). Common QTL affect the rate of tomato seed germination under different stress and nonstress conditions. *International journal of plant genomics*, 2007.

G

Garcia-Senin, S. (2013). Microalgae bio-stimulating effect on traditional tomato agriculture.

Garratt, L. C., Janagoudar, B. S., Lowe, K. C., Anthony, P., Power, J. B., & Davey, M. R. (2002). Salinity tolerance and antioxidant status in cotton cultures. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(4), 502-511.

García-Martínez, A. M., Díaz, A., Tejada, M., Bautista, J., Rodríguez, B., Santa María, C., ...& Parrado, J. (2010). Enzymatic production of an organic soil biostimulant from wheat-condensed distiller solubles: Effects on soil biochemistry and biodiversity. *Process Biochemistry*, 45(7), 1127-1133.

Garcia F., Freile-Pelegrin Y. & Robledo D. 2007 Physiological characterization of *Dunaliella* sp. (Chlorophyta, Volvocales) from Yucatan, Mexico. *Bioresour. Technol.* 98, 1359–1365.

Ghannam, A., Abbas, A., Alek, H., Al-Waari, Z., & Al-Ktaifani, M. (2013). Enhancement of local plant immunity against tobacco mosaic virus infection after treatment with sulphated-carrageenan from red alga (*Hypnea musciformis*). *Physiological and molecular plant pathology*, 84, 19-27.

- Ghareib H. R. 2010 Effect of methanol extract of *Sargassum virgatum* AG (MERT.) – A marine brown macroalga on seed germination and seedling growth of some agriculture crops. *An Inter J of Mar Sci*, 26 (1): 13-21
- Ghars, M. A., Parre, E., Debez, A., Bordenave, M., Richard, L., Leport, L., ...& Abdelly, C. (2008). Comparative salt tolerance analysis between *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*, with special emphasis on K⁺/Na⁺ selectivity and proline accumulation. *Journal of plant physiology*, 165(6), 588-599.
- Ghetti F., Herrmann H., Häder D.P. & Seidlitz H.K. (1999) Spectral dependence of the inhibition of photosynthesis under simulated global radiation in the unicellular green alga *Dunaliella salina*. *J. Photochem. Photobiol. B Biol* 48, 166–173.
- Godlewska, K., Michalak, I., Tuhy, Ł., & Chojnacka, K. (2016). Plant Growth Biostimulants Based on Different Methods of Seaweed Extraction with Water. *BioMed Research International*, 2016.
- Goo, B. G., Baek, G., Choi, D. J., Park, Y. I., Synytsya, A., Bleha, R., ... & Park, J. K. (2013). Characterization of a renewable extracellular polysaccharide from defatted microalgae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource technology*, 129, 343-350.
- Gonçalves, A. L., Rodrigues, C. M., Pires, J. C., & Simões, M. (2016). The effect of increasing CO₂ concentrations on its capture, biomass production and wastewater bioremediation by microalgae and cyanobacteria. *Algal Research*, 14, 127-136.
- Gonzalez, A., Castro, J., Vera, J., & Moenne, A. (2013). Seaweed oligosaccharides stimulate plant growth by enhancing carbon and nitrogen assimilation, basal metabolism, and cell division. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(2), 443-448.
- Gómez PI, González MA. 2005. The effect of temperature and irradiance on the growth and carotenogenic capacity of seven strains of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) cultivated under laboratory conditions. *Biol Res*.38(2-3):151-62.
- Gonzalez, A., Castro, J., Vera, J., & Moenne, A. (2013). Seaweed oligosaccharides stimulate plant growth by enhancing carbon and nitrogen assimilation, basal metabolism, and cell division. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(2), 443-448.

Gloaguen, V., Ruiz, G., Morvan, H., Mouradi-Givernaud, A., Maes, E., Krausz, P., & Strecker, G. (2004). The extracellular polysaccharide of *Porphyridium* sp.: an NMR study of lithium-resistant oligosaccharidic fragments. *Carbohydrate research*, 339(1), 97-103.

Grobelak, A., Napora, A., & Kacprzak, M. (2015). Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth. *Ecological Engineering*, 84, 22-28.

Grzesik, M., & Romanowska-Duda, Z. (2014). Improvements in germination, growth, and metabolic activity of corn seedlings by grain conditioning and root application with cyanobacteria and microalgae. *Pol J Environ Stud*, 23, 1147-1153.

Guo, S., Mao, W., Han, Y., Zhang, X., Yang, C., Chen, Y., ...& Xu, J. (2010). Structural characteristics and antioxidant activities of the extracellular polysaccharides produced by marine bacterium *Edwardsiella tarda*. *Bioresource technology*, 101(12), 4729-4732.

Gupta, S., Rautela, P., Maharana, C., & Singh, K. P. (2017). Priming Host Defense against Biotic Stress by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. In *Agro-Environmental Sustainability* (pp. 255-270). Springer International Publishing.

Guzmán-Murillo, M. A., Ascencio, F., & Larrinaga-Mayoral, J. A. (2013). Germination and ROS detoxification in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) under NaCl stress and treatment with microalgae extracts. *Protoplasma*, 250(1), 33-42.

Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. pp 26-60. In Smith W.L. and Chanley M.H (Eds.) *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York, USA.

Guillard, R.R.L. and Ryther, J.H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can. J. Microbiol.* 8: 229-239.

H

Hadi M.R., Shariati M. & Afsharzadeh A. (2008) Microalgal biotechnology: carotenoid and glycerol production by the green algae *Dunaliella* isolated from the Gave-Khooni saltmarsh, Iran. *Biotechnol. And Bioprocess Engin.* 13, 540-544.

Haimeur, A., Mimouni, V., Ulmann, L., Martineau, A. S., Messaouri, H., Pineau-Vincent, F., ...& Meskini, N. (2016). Fish Oil and Microalga Omega-3 as Dietary Supplements: A

Comparative Study on Cardiovascular Risk Factors in High-Fat Fed Rats. *Lipids*, 51(9), 1037-1049.

Haimour, A., Ulmann, L., Mimouni, V., Guéno, F., Pineau-Vincent, F., Meskini, N., & Tremblin, G. (2012). The role of *Odontella aurita*, a marine diatom rich in EPA, as a dietary supplement in dyslipidemia, platelet function and oxidative stress in high-fat fed rats. *Lipids in health and disease*, 11(1), 147.

Halpern, M., Bar-Tal, A., Ofek, M., Minz, D., Muller, T., Yermiyahu, U., 2015. The use of biostimulants for enhancing nutrient uptake. In: Sparks, D.L. (Ed.), *Advances in Agronomy*, Vol. 129, pp. 141–174.

Han, Q. Q., Wu, Y. N., Gao, H. J., Xu, R., Paré, P. W., Shi, H., ... & Wang, S. M. (2017). Improved salt tolerance of medicinal plant *Codonopsis pilosula* by *Bacillus amyloliquefaciens* GB03. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(1), 35.

Han, Q., Wu, Z., Huang, B., Sun, L., Ding, C., Yuan, S., ... & Liu, J. (2016). Extraction, antioxidant and antibacterial activities of *Broussonetia papyrifera* fruits polysaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 116-124.

Hasui, M., Matsuda, M., Okutani, K., & Shigeta, S. (1995). In vitro antiviral activities of sulfated polysaccharides from a marine microalga (*Cochlodinium polykrikoides*) against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. *International journal of biological macromolecules*, 17(5), 293-297.

Hasegawa P, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51:463–499

Hayashi, K., Hayashi, T., & Kojima, I. (1996). A natural sulfated polysaccharide, calcium spirulan, isolated from *Spirulina platensis*: in vitro and ex vivo evaluation of anti-herpes simplex virus and anti-human immunodeficiency virus activities. *AIDS research and human retroviruses*, 12(15), 1463-1471.

He, C., Yu, Z., da Silva, J. A. T., Zhang, J., Liu, X., Wang, X., ... & Ma, G. (2017). DoGMP1 from *Dendrobium officinale* contributes to mannose content of water-soluble polysaccharides and plays a role in salt stress response. *Scientific Reports*, 7.

Heidari M, Golpayegani A. 2012. Effects of water stress and inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on antioxidant status and photosynthetic pigments in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 11: 57-61.

Hernandez, O.L., Garcia, A.C., Huelva, R., Martínez-Balmori, D., Guridi, F., Aguiar, N.O., Olivares, F.L., Canellas, L.P., 2015. Humic substances from vermicompost enhance urban lettuce production. *Agron. Sustain. Dev.* 35, 225–232

Herrero, M., Jaime, L., Martín-Álvarez, P. J., Cifuentes, A., & Ibáñez, E. (2006). Optimization of the extraction of antioxidants from *Dunaliella salina* microalga by pressurized liquids. *Journal of agricultural and food chemistry*,54(15), 5597-5603.

Hiremath S and PratimaMathad. 2010 Impact of Salinity on the Physiological and Biochemical Traits of *Chlorella vulgaris* Beijerinck. *J. Algal Biomass Utiln*, 1 (2): 51-59.

Ho Myeong Kima, Chi Hoon Ohb, Hyeun-Jong Baea. 2017. Comparison of red microalgae (*Porphyridium cruentum*) culture conditions for bioethanol production. *Bioresource Technology*

Hong-Qi† Z, Croes A. F. and H. F. 1985 Proline accumulation during another development in *petunia hybrida*. *Acta Bot Neer*34, 2, 213–222

Hosseini, S. R. P., Tavakoli, O., & Sarrafzadeh, M. H. (2017). Experimental optimization of SC-CO₂ extraction of carotenoids from *Dunaliella salina*. *The Journal of Supercritical Fluids*, 121, 89-95.

Hu H, Gao K. 2006. Response of growth and fatty acid compositions of *Nannochloropsis* sp. to environmental factors under elevated CO₂ concentration. *Biotechnol Lett.* 28(13):987-92.

HURTADO, AQ, YUNQUE, DA, TIBUBOS, K, CRITCHLEY, 2009. Use of Acadian marine plant extract powder from *Ascophyllum nodosum* in tissue culture of *Kappaphycus* varieties. *J Appl Phycol* 21: pp. 633-639.

I

Ibáñez-González, M. J., Mazzuca-Sobczuk, T., Redondo-Miranda, R. M., Molina-Grima, E., & Cooney, C. L. (2016). A novel vortex flow reactor for the purification of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. *Chemical Engineering Research and Design*, 111, 24-33.

Ibrahim, W. M., Ali, R. M., Hemida, K. A., & Sayed, M. A. (2014). Role of *Ulva lactuca* extract in alleviation of salinity stress on wheat seedlings. *The Scientific World Journal*, 2014.

Ilavarasi A., D. Mubarakali, R. Praveenkumar, E. Baldev and N. Thajuddin, 2011. Optimization of Various Growth Media to Freshwater Microalgae for Biomass Production. *Biotechnology*, 10: 540-545.

J

Jayappriyan, K. R., Rajkumar, R., Venkatakrishnan, V., Nagaraj, S., & Rengasamy, R. (2013). In vitro anticancer activity of natural β -carotene from *Dunaliella salina* EU5891199 in PC-3 cells. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 3(2), 99-105.

Jin, J., Cui, H., Lv, X., Yang, Y., Wang, Y., & Lu, X. (2017). Exogenous CaCl_2 reduces salt stress in sour jujube by reducing Na^+ and increasing K^+ , Ca^{2+} , and Mg^{2+} in different plant organs. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 92(1), 98-106.

Juneja, A., Ceballos, R. M., & Murthy, G. S. (2013). Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: a review. *Energies*, 6(9), 4607-4638.

Jung, H. W., Tschaplinski, T. J., Wang, L., Glazebrook, J., & Greenberg, J. T. (2009). Priming in systemic plant immunity. *Science*, 324(5923), 89-91.

K

Kaewsutas, M., Sarikaphuti, A., Nararatwanchai, T., Sittiprapaporn, P., & Patchanee, P. (2017). Electroencephalographic study of microalgae DHA omega-3 egg consumption on cognitive function. *Journal of Functional Foods*, 29, 46-52.

Kargupta, W., Ganesh, A., & Mukherji, S. (2015). Estimation of carbon dioxide sequestration potential of microalgae grown in a batch photobioreactor. *Bioresource technology*, 180, 370-375.

Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1999). Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by genetransfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature biotechnology*, 17(3), 287-291.

Kassim, Z., John, A., Lim, K. C., Zakaria, N. F., & Asgnari, H. (2014). Sustainable technique for selected live feed culture.

Kauffman, G.L., Kneivel, D.P., Watschke, T.L., 2007. Effects of a biostimulant on the heattoleranceassociatedwithphotosyntheticcapacity, membrane thermostability, and polyphenol production of perennialryegrass. *CropSci.* 47,261–267.

Katz, A., Waridel, P., Shevchenko, A., & Pick, U. (2007). Salt-induced changes in the plasma membrane proteome of the halotolerant alga *Dunaliella salina* as revealed by blue native gel electrophoresis and nano-LC-MS/MS analysis. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6(9), 1459-1472.

Khan, W., Rayirath, U. P., Subramanian, S., Jithesh, M. N., Rayorath, P., Hodges, D. M., ...& Prithiviraj, B. (2009). Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28(4), 386-399.

Kim Kisok et al. 2013. Impact of light intensity, CO₂ concentration and bubble size on growth and fatty acid composition of *Arthrospira (Spirulina) platensis* KMMCC CY-007. biomass and bioenergy 49 (2013) 181e187

Klarzynski, O., Fablet, E., Euzen, M. & Joubert, J.-M., 2006. Etat des connaissances sur les effets des extraits d'algues sur la physiologie des plantes. *Phytoma*, Issue 597.

Kosenko, L. V., Krugova, E. D., Mandrovskaiia, N. M., & Okhrimenko, S. M. (2000). [Effect of plant growth stimulators on *Rhizobium leguminosarum* BV. VICIAE 263b and efficiency of symbiotic nitrogen-fixation in peas]. *Mikrobiolohichniy zhurnal (Kiev, Ukraine: 1993)*, 63(5), 59-66.

Kumar, M., Gupta, A., & Thakur, I. S. (2016). Carbon dioxide sequestration by chemolithotrophic oleaginous bacteria for production and optimization of polyhydroxyalkanoate. *Bioresource technology*.

Kumar, M. S., Ali, K., Dahuja, A., & Tyagi, A. (2015). Role of phytosterols in drought stress tolerance in rice. *Plant Physiology and Biochemistry*, 96, 83-89.

Kumar Manoj; Jyoti Kulshreshtha; Gajendra Pal Singh. 2011. Growth and biopigment accumulation of cyanobacterium *Spirulina platensis* at different light intensities and temperature. *Braz. J. Microbiol.* vol.42 no.3

Kurd, F., & Samavati, V. (2015). Water soluble polysaccharides from *Spirulina platensis*: Extraction and in vitro anti-cancer activity. *International journal of biological macromolecules*, 74, 498-506.

Kvíderová J; Lukavský, J. 2003. The cultivation of *Phaeodactylum tricornutum* in crossed gradients of temperature and light. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes No. 110 (2003)*, p. 67 - 80

L

Lasík, J., Staněk, M., Vančura, V., & Wurst, M. (1979). Effect of bacterial polysaccharides on the growth of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and wheat roots. *Folia microbiologica*, 24(3), 262-268.

Lechevalier, H. A. Volume II Fungi, Algae, Protozoa, and Viruses. 2ème edition, Floride, Laskin, Allen I., 874 p., CRC handbook of microbiology. 1977.

Lemonnier-Le Penhuizic, C., Chatelet, C., Kloareg, B., and Potin, P. (2001). Carrageenan oligosaccharides enhance stress-induced microspore embryogenesis in *Brassica oleracea* var. *italica*. *Plant Sci.* 160, 1211–1220. doi: 10.1016/S0168-9452(01)00372-.

Leu, S., and Boussiba, S. (2014). Advances in the production of high-value products by microalgae. *Ind. Biotechnol.* 10, 169–183. doi: 10.1089/ind.2013.0039

Li, X., Wang, L., & Wang, Z. (2017). Structural characterization and antioxidant activity of polysaccharide from *Hohenbuehelia serotina*. *International Journal of Biological Macromolecules*.

Li, Q., Xia, P. F., Tan, L. R., Wang, Y., Sun, X. F., & Wang, S. G. (2017). Inducible microbial osmotic responses enable enhanced biosorption capability of cyanobacteria. *Biochemical Engineering Journal*.

Liu, X., Luo, Y., Li, Z., Wang, J., & Wei, G. (2017). Role of exopolysaccharide in salt stress resistance and cell motility of *Mesorhizobium alhagi* CCNWXJ12–2T. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1-12.

Liu, J., Willför, S., & Xu, C. (2015). A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 5(1), 31-61.

Liu, H., & Buskey, E. J. (2000). Hypersalinity enhances the production of extracellular polymeric substance (EPS) in the Texas browntide alga, *Aureoumbra lagunensis* (Pelagophyceae). *Journal of Phycology*, 36(1), 71-77.

Lopez-Carrion, A. I., Castellano, R., Rosales, M. A., Ruiz, J. M., & Romero, L. (2008). Role of nitric oxide under saline stress: implications on proline metabolism. *Biologia Plantarum*, 52(3), 587-591.

Luiz, C., Schauffler, G. P., Lemos-Blainski, J. M., Rosa, D. J., & Di Piero, R. M. (2016). Mechanisms of action of aloe polysaccharides and xanthan gum for control of black rot in cauliflower. *Scientia Horticulturae*, 200, 170-177.

M

Mahajan S, Tuteja N (2005) Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch Biochem Biophys* 444:139–158

Manaf, H. H. (2016). Beneficial effects of exogenous selenium, glycine betaine and seaweed extract on salt stressed cowpea plant. *Annals of Agricultural Sciences*, 61(1), 41-48.

Markham JE. et al. 2011. Sphingolipids Containing Very-Long-Chain Fatty Acids Define a Secretory Pathway for Specific Polar Plasma Membrane Protein Targeting in Arabidopsis. *Plant Cell* 23: 2362.

Molassiotis A, Tanou G, Diamantidis G (2012) NO says more than 'YES' to salt tolerance: salt priming and systemic nitric oxide signaling in plants. *Plant Signal Behav* 5:209–2012

Miazek K. & Ledakowicz S. 2013 Chlorophyll from leaves, needles and microalgae: A kinetic approach. *Int J Agric and Biol. Eng.* 6 (2), 107-115.

Michalak, I., Chojnacka, K., & Saeid, A. (2017). Plant Growth Biostimulants, Dietary Feed Supplements and Cosmetics Formulated with Supercritical CO₂ Algal Extracts. *Molecules*, 22(1), 66.

Michalak, I., Chojnacka, K., Dmytryk, A., Wilk, R., Gramza, M., & Rój, E. (2016). Evaluation of supercritical extracts of algae as biostimulants of plant growth in field trials. *Frontiers in plant science*, 7.

- Michalak I and K. Chojnacka, "Algae as production systems of bioactive compounds," *Engineering in Life Sciences*, vol. 15, no. 2, pp. 160–176, 2015.
- Milling, A., Babujee, L., & Allen, C. (2011). *Ralstonia solanacearum* extracellular polysaccharide is a specific elicitor of defense responses in wilt-resistant tomato plants. *PLoS One*, 6(1), e15853.
- Mishra, A., Kavita, K., & Jha, B. (2011). Characterization of extracellular polymeric substances produced by micro-algae *Dunaliella salina*. *Carbohydrate Polymers*, 83(2), 852-857.
- Mishima, T., Murata, J., Toyoshima, M., Fujii, H., Nakajima, M., Hayashi, T., ...& Saiki, I. (1998). Inhibition of tumor invasion and metastasis by calciumspirulan (Ca-SP), a novel sulfated polysaccharide derived from a blue-green alga, *Spirulina platensis*. *Clinical & experimental metastasis*, 16(6), 541-550.
- Moenne, A. (2016). Marine Algae Oligo-carrageenans (OCs) Stimulate Growth and Defense Responses in Terrestrial Plants. In *Research Progress in Oligosaccharins* (pp. 41-49). Springer New York.
- Mohsenpour, S. F., & Willoughby, N. (2016). Effect of CO₂ aeration on cultivation of microalgae in luminescent photobioreactors. *Biomass and Bioenergy*, 85, 168-177.
- Mona Ismail A., 2014 Exogenous Proline Induced Changes in SDS-PAGE Protein Profile for Salt Tolerance in Wheat (*Triticumaestivum* L.) Seedlings. *Rese J of Pharma, Biol and Chem Sci*. 748-755.
- Monteiro C.C., Carvalho R.F., Gratão P.L., Carvalho G., Tezotto T., Medici, L.O., Peres L.E.P. & Azevedo R.A. 2011 Biochemical responses of the ethylene-insensitive Never ripe tomato mutant subjected to cadmium and sodium stresses. *Envir and Exper Bot* 71, 306-320.
- Mostafa, G. G. (2015). Improving the Growth of Fennel Plant Grown under Salinity Stress using some Biostimulants. *American Journal of Plant Physiology*, 10(2), 77-83.
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 651-681.
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, cell&environment*, 25(2), 239-250.

Munns, R., & Termaat, A. (1986). Whole-plant responses to salinity. *Functional Plant Biology*, 13(1), 143-160.

Muñoz, A. M., Ponce, J. C., and Araya, J. V. (2011). *Method to Stimulate Carbon Fixation in Plants with an Aqueous Solution of Oligo-Carrageenans Selected from Kappa1, Kappa2, Lambda or Iota*. U.S. Patent Application 12/911,790.

Murthy, K. C., Vanitha, A., Rajesha, J., Swamy, M. M., Sowmya, P. R., & Ravishankar, G. A. (2005). In vivo antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina*—a green microalga. *Life Sciences*, 76(12), 1381-1390.

N

Nabti, E., Jha, B., & Hartmann, A. (2016). Impact of seaweeds on agricultural crop production as biofertilizer. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 1-16.

Nardi, S., Pizzeghello, D., Schiavon, M., & Ertani, A. (2016). Plant biostimulants: physiological responses induced by protein hydrolyzed-based products and humic substances in plant metabolism. *Scientia Agricola*, 73(1), 18-23.

Nardi S, Carletti P, Pizzeghello D, Muscolo A. 2009. Biological activities of humic substances. In:

Senesi N, Xing B, Huang PM, editors. *Biophysico-chemical processes involving natural nonliving organic matter in environmental systems*. Vol 2. Hoboken, NJ: Wiley; p. 305 – 340.

Näsholm T., Huss-Danell K., P. Hogberg, Uptake of organic nitrogen in the field by four agriculturally important plant species, *Ecology* 81 (2000) 1155e1161

Nerissa A, Farrell A, Ramsubhag A, Jayaraman J. 2015 The effect of *Ascophyllum nodosum* extract on the growth, yield and fruit quality of tomato grown under tropical conditions. *J. of App Phycolpp* 1-10

Nuño, K., Villarruel-López, A., Puebla-Pérez, A. M., Romero-Velarde, E., Puebla-Mora, A. G., & Ascencio, F. (2013). Effects of the marine microalgae *Isochrysis galbana* and *Nannochloropsis oculata* in diabetic rats. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 106-115.

O

Olivares, F.L., Aguiar, N.O., Rosa, R.C.C., Canellas, L.P., 2015. Substrate biofortification in combination with foliar sprays of plant growth promoting bacteria and humic substances boosts production of organic tomatoes. *Sci. Hortic.* 183, 100–108.

Olmos, J., Gómez, R., & Rubio, V. P. (2015). Apoptosis Comparison Effects between Synthetic and Natural B-Carotene from *Dunaliella salina* on MDA-MB-231 Brest Cancer Cells. *J Microb Biochem Technol*, 7, 051-056.

Oswald, W. J., & Golueke, C. G. (1960). Biological transformation of solar energy. *Advances in applied microbiology*, 2, 223-262.

Ozturk Sahlan&BelmaAslim. 2010 Modification of exopolysaccharide composition and production by three cyanobacterial isolates under salt stress. *Environ SciPollutRes* 17:595–602

P

Paiva S.A. & Russell R.M. 1999 Beta-carotene and other carotenoids as antioxidants. *J Am CollNutr.* 18(5), 426-433.

Parida AK, Das AB (2005) Salt tolerance and salinity effect on plants: a review. *Ecotoxicol Environ Saf* 60:324–349

Patel, A. K., Laroche, C., Marcati, A., Ursu, A. V., Jubeau, S., Marchal, L., ... & Michaud, P. (2013). Separation and fractionation of exopolysaccharides from *Porphyridium cruentum*. *Bioresource technology*, 145, 345-350.

Pedranzani, H., Racagni, G., Alemano, S., Miersch, O., Ramírez, I., Peña-Cortés, H., ... & Abdala, G. (2003). Salt tolerant tomato plants show increased levels of jasmonic acid. *Plant Growth Regulation*, 41(2), 149-158.

Penella, C., Landi, M., Guidi, L., Nebauer, S. G., Pellegrini, E., San Bautista, A., ...& Calatayud, A. (2016). Salt-tolerant rootstock increases yield of pepper under salinity through maintenance of photosynthetic performance and sinks strength. *Journal of plant physiology*, 193, 1-11.

Peterson A.A, F. Vogel, R.P. Lachance, M. Fröling, M.J. Antal, Jr., J.W. Tester, *Energy Environmental Science*, 2008, 1, 32-65

Petrozza A, Summerer S, Di Tommaso G, Di Tommaso D, Piaggese A. 2013a. Evaluation of the effect of Radifarmwtreatment on the morpho-physiological characteristics of rootsystems via image analysis. *Acta Hortic.* 1009:149–153.

Petrozza A, Summerer S, Di Tommaso G, Di Tommaso D, Piaggese A. 2013b. An evaluation of tomato plant rootdevelopment and morpho-physiologicalresponsetreatedwithVIVAw by image analysis. *Acta Hortic.* 1009:155–159.

Phanduang, O., Lunprom, S., Salakkam, A., & Reungsang, A. (2017). Anaerobic solid-state fermentation of bio-hydrogen from microalgal *Chlorella* sp. biomass. *International Journal of Hydrogen Energy*.

Phytoma, 2005. Mécanismes d'action de l'extrait d'algue GA7. *Phytoma - La défense des végétaux*, Issue 585, pp. 42-44.

Piloto-Rodríguez, R., Sánchez-Borroto, Y., Melo-Espinosa, E. A., & Verhelst, S. (2017). Assessment of diesel engine performance when fueled with biodiesel from algae and microalgae: An overview. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 69, 833-842.

Pitzschke, A., Datta, S., & Persak, H. (2014). Salt stress in *Arabidopsis*: lipid transfer protein AZI1 and its control by mitogen-activated protein kinase MPK3. *Molecular plant*, 7(4), 722-738.

Price, C.A., 1965. A membrane method for determination of total protein in dilute algal suspensions. *Anal.biochem.* 12, 213-218.

Priyadarshani, I., & Rath, B. (2012). Commercial and industrial applications of micro algae—A review. *J algal biomass utln*, 3(4), 89-100.

Pulz, O., Gross, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. Minireview, *AppliedMicrobiology and Biotechnology*, Volume 65, Number 6, pp. 635- 648. 2004.

Priester JH, Olson SG, Webb SM, Neu MP, Hersman LE, Holden PA 2006 Enhanced exopolymer production and chromium stabilization in *Pseudomonas putida* unsaturated biofilms. *Appl Environ Microb* 72:1988–1996

Q

Qi, J., & Kim, S. M. (2017). Characterization and immunomodulatory activities of polysaccharides extracted from green alga *Chlorella ellipsoidea*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 106-114.

Qurashi, A. W., & Sabri, A. N. (2012). Bacterial exopolysaccharide and biofilm formation stimulate chickpea growth and soil aggregation under salt stress. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(3), 1183-1191.

R

Ra, C. H., Kang, C. H., Jung, J. H., Jeong, G. T., & Kim, S. K. (2016). Effects of light-emitting diodes (LEDs) on the accumulation of lipid content using a two-phase culture process with three microalgae. *Bioresource technology*, 212, 254-261.

Rahmoune, B., Morsli, A., Khelifi-Slaoui, M., Khelifi, L., Strueh, A., Erban, A., ...& van Dongen, J. T. (2017). Isolation and characterization of three new PGPR and their effects on the growth of *Arabidopsis* and *Datura* plants. *Journal of Plant Interactions*, 12(1), 1-6.

Ramirez-Estrada, K., Vidal-Limon, H., Hidalgo, D., Moyano, E., Golenioswki, M., Cusidó, R. M., & Palazon, J. (2016). Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules*, 21(2), 182.

Ramos, A. A., Polle, J., Tran, D., Cushman, J. C., Jin, E., & Varela, J. C. (2011). The unicellular green alga *Dunaliella salina* Teod as a model for abiotic stress tolerance: genetic advances and future perspectives. *Algae*, 26(1), 3.

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.

Rasool, S., Hameed, A., Azooz, M. M., Siddiqi, T. O., & Ahmad, P. (2013). Salt stress: causes, types and responses of plants. In *Ecophysiology and responses of plants under salt stress* (pp. 1-24). Springer New York.

RAYIRATH P., BENKEL B., 2009. Lipophilic components of the brown seaweed, *Ascophyllum nodosum*, enhance freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 230: pp. 135-147

Renaud S. M., H. C. Zhou, D. L. Parry, L. V. Thinh, K. C. Woo. 1995 Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgae *Isochrysis* sp., *Nitzschia closterium*, *Nitzschia paleacea*, and commercial species *Isochrysis* sp. (clone T.ISO). *Journal of Applied Phycology* 7: 595-602

Renaud S. M., D. L. Parry, T. Luong-Van, C. Kuo, A. Padovan, N. Sammy. 1991 Effect of light intensity on proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp. and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. *Journal of Applied Phycology* 3: 43-53.

Renaud S. M., H. C. Zhou, D. L. Parry, L. V. Thinh, K. C. Woo. 1995 Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgae *Isochrysis* sp., *Nitzschia closterium*, *Nitzschia paleacea*, and commercial species *Isochrysis* sp. (clone T.ISO). *Journal of Applied Phycology* 7: 595-602

Rengasamy, K. R., Kulkarni, M. G., Papenfus, H. B., & Van Staden, J. (2016). Quantification of plant growth biostimulants, phloroglucinol and eckol, in four commercial seaweed liquid fertilizers and some by-products. *Algal Research*, 20, 57-60.

Richmond A. 1986 Microalgae of economic potential. In *Handbook of Microalgal Mass Cultures*. Edited by A. Richmond. Florida: CRC Press, Inc., pp. 199-243.

Rincon A, Valladares F, Gimeno TE, Pueyo JJ. 2008. Water stress responses of two Mediterranean tree species influenced by native soil microorganisms and inoculation with a plant growth promoting rhizobacterium. *Tree Physiology* 28: 1693-1701.

Rizza, L. S., Smachetti, M. E. S., Do Nascimento, M., Salerno, G. L., & Curatti, L. (2017). Bioprospecting for native microalgae as an alternative source of sugars for the production of bioethanol. *Algal Research*, 22, 140-147.

Rocha de Souza, M. C., Marques, C. T., Guerra Dore, C. M., Ferreira da Silva, F. R., Oliveira Rocha, H. A., and Leite, E. L. (2007). Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. *J. Appl. Phycol.* 153–160. doi: 10.1007/s10811-006-9121-z

Roleda Y., Slocombe P., Leakey J.G., Day G., Bell M. Stanley S. Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. 2013. *Bioresource Technology* 129 :439–449.

Rosales-Mendoza, S., Paz-Maldonado, L. M. T., and Soria-Guerra, R. E. (2012). *Chlamydomonas reinhardtii* as a viable platform for the production of recombinant proteins: current status and perspectives. *Plant Cell Rep.* 31, 479–494. doi: 10.1007/s00299-011-1186-8

Russell, N. J., and Nichols, D. S. (1999). Polyunsaturated fatty acids in marine bacteria – a dogma rewritten. *Microbiology* 145, 767–779. doi: 10.1099/13500872-145-4-767

Ryu, B., Himaya, S. W. A., & Kim, S. K. (2015). Applications of Microalgae-Derived Active Ingredients as Cosmeceuticals.

S

Saa, S., Rio, O. D., Castro, S., & Brown, P. H. (2015). Foliar application of microbial and plant based biostimulants increases growth and potassium uptake in almond (*Prunus dulcis* [Mill.] DA Webb). *Frontiers in plant science*, 6, 87.

Saha, S. K., Moane, S., & Murray, P. (2013). Effect of macro-and micro-nutrient limitation on superoxide dismutase activities and carotenoid levels in microalga *Dunaliella salina* CCAP 19/18. *Bioresource technology*, 147, 23-28.

Schiavon, M.; Ertani, A.; Nardi, S. 2008. Effects of an alfalfa protein hydrolysate on the gene expression and activity of enzymes of TCA cycle and N metabolism in *Zea mays* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 11800-11808.

Scranton, M. A., Ostrand, J. T., Fields, F. J., and Mayfield, S. P. (2015). *Chlamydomonas* as a model for biofuels and bio-products production. *Plant J.* 82, 523–531. doi: 10.1111/tpj.12780

Sevda, S., Bhattacharya, S., Reesh, I. M. A., Bhuvanesh, S., & Sreekrishnan, T. R. (2017). Challenges in the Design and Operation of an Efficient Photobioreactor for Microalgae Cultivation and Hydrogen Production. In *Biohydrogen Production: Sustainability of Current Technology and Future Perspective* (pp. 147-162). Springer India.

Shabala L, Mackay A, Tian Y, Jacobsen SE, Zhou D, Shabala S. 2012. Oxidative stress protection and stomatal patterning as components of salinity tolerance mechanism in quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Physiologia Plantarum* 146: 26–38.

- Shabana, E. F., Gabr, M. A., Moussa, H. R., El-Shaer, E. A., & Ismaiel, M. M. (2017). Biochemical composition and antioxidant activities of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* in response to gamma irradiation. *Food chemistry*, 214, 550-555.
- Salla, A. C. V., Margarites, A. C., Seibel, F. I., Holz, L. C., Brião, V. B., Bertolin, T. E., ... & Costa, J. A. V. (2016). Increase in the carbohydrate content of the microalgae *Spirulina* in culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate. *Bioresource technology*, 209, 133-141.
- Salati, S., D'Imporzano, G., Menin, B., Veronesi, D., Scaglia, B., Abbruscato, P., ...& Adani, F. (2017). Mixotrophic cultivation of *Chlorella* for local protein production using agro-food by-products. *Bioresource Technology*, 230, 82-89.
- Sheng-Yi Chi, Chien-Ya Kao, Ming-Ta Tsai a, Seow-Chin Ong a, Chiun-Hsun Chen b, Chih-Sheng Lin. 2009. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. *Bioresource Technology* 100 (2009) 833–838
- Sangha, J. S., Ravichandran, S., Prithiviraj, K., Critchley, A. T., & Prithiviraj, B. (2010). Sulfated macroalgal polysaccharides λ -carrageenan and ι -carrageenan differentially alter *Arabidopsis thaliana* resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Physiological and molecular plant pathology*, 75(1), 38-45.
- Schiavon, M., Ertani, A., & Nardi, S. (2008). Effects of an alfalfa protein hydrolysate on the gene expression and activity of enzymes of the tricarboxylic acid (TCA) cycle and nitrogen metabolism in *Zeamays L.* *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(24), 11800-11808.
- Schmidt, J. J., Gagnon, G. A., & Jamieson, R. C. (2016). Microalgae growth and phosphorus uptake in wastewater under simulated cold region conditions. *Ecological Engineering*, 95, 588-593.
- Shah, M. T., Zodape, S. T., Chaudhary, D. R., Eswaran, K., & Chikara, J. (2013). Seaweed sap as an alternative liquid fertilizer for yield and quality improvement of wheat. *Journal of plant nutrition*, 36(2), 192-200.
- Shahbazi, F., Nejad, M. S., Salimi, A., & Gilani, A. (2015). Effect Of Seaweed Extracts On The Growth And Biochemical Constituents Of Wheat. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 8(3), 283.

- Shahidi, F., and Ambigaipalan, P. (2015). Novel functional food ingredients from marine sources. *Curr. Opin. Food Sci.* 2, 123–129. doi: 10.1016/j.cofs.2014.12.009
- Sharma Naveen Kumar, Rai A.K., 2011. Biodiversity and biogeography of microalgae: progress and pitfalls, 15, 1–15.
- Shekharam, K. M., Venkataraman, L. V., & Salimath, P. V. (1987). Carbohydrate composition and characterization of two unusual sugars from the blue green alga *Spirulina platensis*. *Phytochemistry*, 26(8), 2267-2269.
- Shibuya, N., & Minami, E. (2001). Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 59(5), 223-233.
- Shukla, P. S., Borza, T., Critchley, A. T., & Prithiviraj, B. (2016). Carrageenans from red seaweeds as promoters of growth and elicitors of defense response in plants. *Frontiers in Marine Science*, 3, 81.
- Sigaud and Aidar. 1993. Salinity and temperature effects on the growth and chlorophyll-a content of some planktonic algae. *Boletim Do Instituto Oceanografico*. 41(1-2): 95-10
- Simic, S. G., Tusevski, O., Maury, S., Delaunay, A., Lainé, E., Joseph, C., & Hagège, D. (2015). Polysaccharide elicitors enhance phenylpropanoid and naphthodianthrone production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 122(3), 649-663.
- Singh, P., Baranwal, M., & Reddy, S. M. (2016). Antioxidant and cytotoxic activity of carotenes produced by *Dunaliella salina* under stress. *Pharmaceutical biology*, 1-7.
- Singh, J., Sastry, E. D., & Singh, V. (2012). Effect of salinity on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) during seed germination stage. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 18(1), 45-50.
- Sirbu, C., Cioroianu, T., Grigore, A., Stanescu, A. M., Rujoi, B., Marin, N., ...& Nicu, E. (2017). OBTAINING AND TESTING OF FERTILIZERS WITH ORGANIC SUBSTANCES. *Annals of the University of Craiova-Agriculture, Montanology, Cadastre Series*, 46(1), 376-381.
- Slocombe, S.P., Ross, M., Thomas, N., McNeill, S., Stanley, M.S., 2013. A rapid and general method for measurement of protein in micro-algal biomass, *Biores. Technol.* 129, 51–57.

Smejkalova D, Piccolo A (2008) Aggregation and disaggregation of humicsupramolecularassemblies by NMR diffusion orderedspectrometry (DOSY-NMR). *Environmental Science and Technology* 42: 699-706.

Soanen, N., Da Silva, E., Gardarin, C., Michaud, P., & Laroche, C. (2016). Improvement of exopolysaccharide production by *Porphyridium marinum*. *Bioresource technology*.

Sommerfeld, M. (2014). Evaluation of Potential Agricultural Applications of the Microalga *Scenedesmus dimorphus* (Doctoral dissertation, ARIZONA STATE UNIVERSITY).

Specht, E. A., and Mayfield, S. P. (2012). Synthetic oligonucleotide libraries reveal novel regulatory elements in *Chlamydomonas* chloroplast mRNAs. *ACS Synth. Biol.* 2, 34–46. doi: 10.1021/sb300069k

Sridhar S., Rengasamy R. Influence of seaweed liquid fertilizer on growth and biochemical characteristics of *Arachis hypogea* L. under field trial. *Journal of Ecobiotechnology*. 2011;3:18–22.

Sun, Y., Wang, H., Guo, G., Pu, Y., & Yan, B. (2014). The isolation and antioxidant activity of polysaccharides from the marine microalgae *Isochrysis galbana*. *Carbohydrate polymers*, 113, 22-31.

Surasak S, Samuel T, Desh Pal S. V, and Richard T. S. 2002 Molecular Mechanisms of Proline-Mediated Tolerance to Toxic Heavy Metals in Transgenic Microalgae. *Plant Cell*. 14(11): 2837–2847.

Stadnik, M. J., & Freitas, M. B. D. (2014). Algal polysaccharides as source of plant resistance inducers. *Tropical Plant Pathology*, 39(2), 111-118.

Stefan M, Munteanu N, Stoleru V, Mihasan M, Hritcu L. 2013. Seed inoculation with plant growth promoting rhizobacteria enhances photosynthesis and yield of runner bean (*Phaseolus coccineus* L.). *Scientia Horticulturae* 151: 22-29.

Sumi, Y. (2009). Microalgae pioneering the future-application and utilization.

Szarka, A., Tomasskovics, B., & Bánhegyi, G. (2012). The ascorbate-glutathione- α -tocopherol triad in abiotic stress response. *International journal of molecular Sciences*, 13(4), 4458-4483.

- Takagi M, Karseno, and Yoshida T. (2006) Effect of Salt Concentration on Intracellular Accumulation of Lipids and Triacylglyceride in Marine Microalgae *Dunaliella* Cells. *J of bioscie and bioeng.* 101, No. 3, 223–226
- Talat A., Nawaz K., Hussian K., Bhatti K.H., Siddiqi E.H., Aneela K., SehrishA. & Sharif M.U. 2013 Foliar Application of Proline for Salt Tolerance of Two Wheat (*Triticumaestivum* L.) Cultivars. *W AppliSci J* 22 (4), 547-554.
- Taleb, H., Vale, P., Jaime, E., & Blaghen, M. (2001). Study of paralytic shellfish poisoning toxin profile in shellfish from the Mediterranean shore of Morocco. *Toxicon*, 39(12), 1855-1861.
- Tammam A.A., Fakhry E.M. & El-Sheekh.M. 2011 Effect of salt stress on antioxidant system and the metabolism of the reactive oxygen species in *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta*. *Afri J of Biotech* 10(19), 3795-3808.
- Tang, Z., Ju, B., Li, W., Wen, S., Pu, Y., & Qin, S. (2016). One-step chromatographic procedure for purification of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. *Protein expression and purification*, 123, 70-74.
- Taraldsvik M, Myklestad SM 2000 The effect of pH on growth rate, biochemical composition and extracellular carbohydrate production of the marine diatom *Skeletonema costatum*. *J Phycol* 36:189–194.
- Tasić, M. B., Pinto, L. F. R., Klein, B. C., Veljković, V. B., & Maciel Filho, R. (2016). *Botryococcus braunii* for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 64, 260-270.
- Tavakkoli E, Rengasamy P, McDonald GK (2010) High concentrations of Na + and Cl – ions in soil solution have simultaneous detrimental effects on growth of faba bean under salinity stress. *J Exp Bot* 61:4449–4459
- Tavallaie, S., Emtiazjoo, M., Rostami, K., Kosari, H., & Assadi, M. M. (2015). Comparative studies of β -carotene and protein production from *Dunaliella salina* isolated from Lake Hoze-soltan, Iran. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 24(1), 79-90.
- Tavares, O. C. H., Santos, L. A., Ferreira, L. M., Sperandio, M. V. L., da Rocha, J. G., García, A. C., ... & Fernandes, M. S. (2017). Humic acid differentially improves nitrate kinetics under

low, and high, affinity systems and alters the expression of plasma membrane H⁺-ATPases and nitrate transporters in rice. *Annals of Applied Biology*, 170(1), 89-103.

Tawfiq S. Abu-Rezq, Suad Al-Hooti & Dangly A. Jacob. 2010. Optimum culture conditions required for the locally isolated *Dunaliella salina*. *J. Algal Biomass Utln.* 1 (2): 12-19

Thomas N. V., Kim S.-K. Beneficial effects of marine algal compounds in cosmeceuticals. *Marine Drugs*.2013;11(1):146–164. doi: 10.3390/md11010146.

Torzillo, G, Vonshak, A. 1994. Effect of light and temperature on the photosynthetic activity of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Biomass and Bioenergy* Volume 6, Issue 5, Pages 399–403

Trabelsi L, Ben Ouada H, Bacha H and Ghoul M. 2009. Combined effect of temperature and light intensity on growth and extracellular polymeric substance production by the cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *J Appl Phycol* 21:405–412

Turu, I. C., Turkcan-Kayhan, C., Kazan, A., Yildiz-Ozturk, E., Akgol, S., & Yesil-Celiktas, O. (2016). Synthesis and characterization of cryogel structures for isolation of EPSs from *Botryococcus braunii*. *Carbohydrate Polymers*, 150, 378-384.

U

Udenigwe, C.C., & Aluko, R.E. (2012). Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *Journal of Food Science*, 77, R11–R24.

University of Gothenburg & others, "Microalgae, a market analysis carried out as part of the Interreg KASK IVA project: Blue technology for Sustainable Innovations, "Blue Bio"," 2013.

Upchurch, R. G. (2008). Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnology letters*, 30(6), 967-977.

Uslu, Işık, Sayın, Yaşar. The Effect of Temperature on Protein and Amino Acid Composition of *Spirulina platensis*. 2009. E.U. *Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*. Cilt/Volume 26, Issue 2: 139-142

Uysal, O., Uysal, F. O., & Ekinçi, K. (2015). Evaluation of Microalgae as Microbial Fertilizer. *European Journal of Sustainable Development*, 4(2), 77.

V

Varsha, K. K., Devendra, L., Shilpa, G., Priya, S., Pandey, A., & Nampoothiri, K. M. (2015). 2, 4-Di-tert-butyl phenol as the antifungal, antioxidant bioactive purified from a newly isolated *Lactococcus* sp. *International journal of food microbiology*, 211, 44-50.

Vera, J., Castro, J., Gonzalez, A., & Moenne, A. (2011). Seaweed polysaccharides and derived oligosaccharides stimulate defense responses and protection against pathogens in plants. *Marine drugs*, 9(12), 2514-2525.

Verkleij, F. N. (1992). Seaweed extracts in agriculture and horticulture: a review. *Biological Agriculture & Horticulture*, 8(4), 309-324.

Vo, T. S., and Kim, S. K. (2010). Potential anti-HIV agents from marine resources: an overview. *Mar. Drugs* 8, 2871–2892. doi: 10.3390/md8122871

Vranova, V., Rejsek, K., Skene, K.R., Formanek, P., 2011. Non-proteinaminoacids: plant, soil and ecosystem interactions. *Plant Soil* 342, 31–48.

W

Wang, N., Qi, H., Qiao, W., Shi, J., Xu, Q., Zhou, H., ...& Huang, Q. (2017). Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) genotypes with contrasting K⁺/Na⁺ ion homeostasis: implications for salinity tolerance. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(3), 77.

Wang, H. M. D., Chen, C. C., Huynh, P., & Chang, J. S. (2015). Exploring the potential of using algae in cosmetics. *Bioresource technology*, 184, 355-362.

Wang CJ, Yang W, Wang C, Gu C, Niu DD, Liu HX, Wang YP, Guo JH. 2012. Induction of drought tolerance in cucumber plants by a consortium of three plant growthpromoting rhizobacterium strains. *PLoS One* 7.

Wang, K., Senthil-Kumar, M., Ryu, C. M., Kang, L., & Mysore, K. S. (2012). Phytosterols play a key role in plant innate immunity against bacterial pathogens by regulating nutrient efflux into the apoplast. *Plant Physiology*, pp-111.

Wuang, S. C., Khin, M. C., Chua, P. Q. D., & Luo, Y. D. (2016). Use of *Spirulina* biomass produced from treatment of aquaculture wastewater as agricultural fertilizers. *Algal Research*, 15, 59-64.

Wu, S., Fu, X., Brennan, M. A., Brennan, C. S., & Chun, C. (2016). The Effects of Different Purifying Methods on the Chemical Properties, in Vitro Anti-Tumor and Immunomodulatory Activities of *Abrus cantoniensis* Polysaccharide Fractions. *International journal of molecular sciences*, 17(4), 511.

Widianingsih, Retno Hartati, Hadi Endrawati and Jane Mamuaja. Fatty acid composition of marine microalgae in Indonesia. *Journal of tropical biology and conservation* 10: 75-82

X

Xiang-Jun Chen Xin-Hang Zhang Li-Dan Hu Jia-Quan Zhang Yan Jiang Yi Yang Yong-Bin Yan. 2015. : DsCaf1 is involved in environmental stress response of *Dunaliella salina*. Volume 82, January 2016, Pages 369–374

Xie, J. H., Wang, Z. J., Shen, M. Y., Nie, S. P., Gong, B., Li, H. S., ... & Xie, M. Y. (2016). Sulfated modification, characterization and antioxidant activities of polysaccharide from *Cyclocarya paliurus*. *Food Hydrocolloids*, 53, 7-15.

Xu, X., Luo, L., Liu, C., & McClements, D. J. (2017). Utilization of anionic polysaccharides to improve the stability of rice glutelin emulsions: Impact of polysaccharide type, pH, salt, and temperature. *Food Hydrocolloids*, 64, 112-122.

Xu, C., & Leskovar, D. I. (2015). Effects of *A. nodosum* seaweed extracts on spinach growth, physiology and nutrition value under drought stress. *Scientia Horticulturae*, 183, 39-47.

Xu, S. F., Ye, Y. P., Li, X. Y., & Chen, F. Y. (2011). Chemical composition and antioxidant activities of different polysaccharides from the roots of *Angelica dahurica*. *Chemistry & biodiversity*, 8(6), 1121-1131.

Y

Yamagata M and Noriharu AE. Direct Acquisition of Organic Nitrogen by Crops JARQ 33 15-22 (1999)

Ye, H., Wang, K., Zhou, C., Liu, J., & Zeng, X. (2008). Purification, antitumor and antioxidant activities in vitro of polysaccharides from the brown seaweed *Sargassum pallidum*. *Food Chemistry*, 111(2), 428-432.

Yin, Y. X., Wang, S. B., Xiao, H. J., Zhang, H. X., Zhang, Z., Jing, H., ... & Gong, Z. H. (2014). Overexpression of the CaTIP1-1 pepper gene in tobacco enhances resistance to osmotic stresses. *International journal of molecular sciences*, 15(11), 20101-20116.

Yildirim, E., & Güvenç, İ. (2006). Salt tolerance of pepper cultivars during germination and seedling growth. *Turkish journal of agriculture and forestry*, 30(5), 347-353.

Yu, X. H., Liu, Y., Wu, X. L., Liu, L. Z., Fu, W., & Song, D. D. (2017). Isolation, purification, characterization and immunostimulatory activity of polysaccharides derived from American ginseng. *Carbohydrate Polymers*, 156, 9-18.

Yu, S.-M., Lo, S.-F., and Ho, T.-H. D. (2015). Source–sink communication: regulated by hormone, nutrient, and stress cross-signaling. *Trends Plant Sci.* 20, 844–857. doi: 10.1016/j.tplants.2015.10.009

Z

Zandalinas, S. I., Mittler, R., Balfagón, D., Arbona, V., & Gómez-Cadenas, A. (2017). Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. *Physiologia Plantarum*.

Zhao, X., Wei, P., Liu, Z., Yu, B., & Shi, H. (2017). Soybean Na⁺/H⁺ antiporter GmsSOS1 enhances antioxidant enzyme activity and reduces Na⁺ accumulation in Arabidopsis and yeast cells under salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(1), 19.

Zheng, Y., Li, Z., Tao, M., Li, J., & Hu, Z. (2017). Effects of selenite on green microalga *Haematococcus pluvialis*: Bioaccumulation of selenium and enhancement of astaxanthin production. *Aquatic Toxicology*, 183, 21-27.

Zheng Yang, Chen Zhaoan, Lu Hongbin and Zhang Wei. 2011. Optimization of carbon dioxide fixation and starch accumulation by *Tetraselmis subcordiformis* in a rectangular airlift photobioreactor. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(10), pp. 1888-1901

Zodape, S. T., Gupta, A., Bhandari, S. C., Rawat, U. S., Chaudhary, D. R., Eswaran, K., & Chikara, J. (2011). Foliar application of seaweed sap as biostimulant for enhancement of yield and quality of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *J Sci Ind Res*, 70, 215-219.

Annexes :*Annexe 1: Milieu des microalgues marines*
Milieu Walne (Walne 1970)

Constituant	Solution stock (g.L ⁻¹ dH ₂ O)	Quantité	Concentration finale dans le milieu (M)
NaNO ₃		100.0 g	1.18. 10 ⁻³
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O		20.0 g	1.28. 10 ⁻⁴
MnCl ₂ · 4H ₂ O		0.36 g	1.82. 10 ⁻⁶
H ₃ BO ₃		33.6 g	5.43. 10 ⁻⁴
FeCl ₃ · 6H ₂ O		1.3 g	4.81. 10 ⁻⁶
Na ₂ EDTA · H ₂ O		45.0 g	1.54 .10 ⁻⁴
Solution des éléments en trace	Voir recette	1ml	-

Solution stock des éléments trace

Constituant	Solution stock (g.L ⁻¹ dH ₂ O)	Quantité	Concentration finale dans le milieu (M)
ZnCl ₂	-	21.0 g	1.54. 10 ⁻⁷
CoCl ₂ · 6H ₂ O	-	20.0 g	8.41 . 10 ⁻⁸
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	-	9.0 g	7.28 . 10 ⁻⁹
CuSO ₄ · 5H ₂ O	-	20.0 g	8.01 . 10 ⁻⁸

Solution de vitamines

Constituant	Solution stock (g.L ⁻¹ dH ₂ O)	Quantité	Concentration finale dans le milieu (M)
Thiamine · HCl		1g	$2.96 \cdot 10^{-10}$
Cyanocobalamine	1.0	50 mg	$3.69 \cdot 10^{-12}$

Milieu f/2 (Guillard and Ryther 1962, Guillard 1975)

Stocks

	per litre
(1) NaNO ₃	75g
(2) NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	5.65g
(3) Trace elements (chelated)	
NA ₂ EDTA	4.16 g
FeCl ₃ .6H ₂ O	3.15 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.01 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.022 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.01 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.18 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.006 g
(4) Vitamin mix	
Cyanocobalamin (Vitamin B ₁₂)	0.0005 g
Thiamine HCl (Vitamin B ₁)	0.1 g
Biotin	0.0005 g

Medium

	per litre
NaNO ₃	1.0 ml
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	1.0 ml
Trace elements stock solution	1.0 ml
Vitamin mix stock solution	1.0 ml

Annexe 2: Milieux de culture de la spiruline
Milieu 1: Le milieu Zarrouk (Zarrouk 1966)

Constituant	Concentration (g/L)
K ₂ HPO ₄	0.5
NaNO ₃	2.5
K ₂ SO ₄	1.0
NaCl	1.0
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.2
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.04
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01
EDTA	0.08
Solution de microéléments	
1mL	
H ₃ BO ₃	2.86
MnCl ₂ .4H ₂ O	1.81
ZnSO ₄ .4H ₂ O	0.222
Na ₂ MoO ₄	0.0177
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.079

Milieu 2: *Spirulina* medium Aiba, S. & Ogawa, T. (1977):

Stock solution	Volume	Composant	Concentration	Concentration
----------------	--------	-----------	---------------	---------------

SL I	500 mL	NaHCO ₃	13.61 g · 500 mL ⁻¹	4.05 · 10 ⁻² M
		Na ₂ CO ₃	4.03 g · 500 mL ⁻¹	9.50 · 10 ⁻³ M
		K ₂ HPO ₄	0.50 g · 500 mL ⁻¹	7.17 · 10 ⁻⁴ M
SL II	500 mL	NaNO ₃	2.50 g · 500 mL ⁻¹	7.35 · 10 ⁻³ M
		K ₂ SO ₄	1.00 g · 500 mL ⁻¹	1.43 · 10 ⁻³ M
		NaCl	1.00 g · 500 mL ⁻¹	4.27 · 10 ⁻³ M
		MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.20 g · 500 mL ⁻¹	4.15 · 10 ⁻⁴ M
		CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.04 g · 500 mL ⁻¹	9.01 · 10 ⁻⁵ M
		FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01 g · 500 mL ⁻¹	1.64 · 10 ⁻⁵ M
		EDTA (Titriplex III)	0.08 g · 500 mL ⁻¹	
		micronutrient solution*	5.0 mL · 500 mL ⁻¹	

Solution de micronutriments

Solution I	Soution II	Solution I and II
881 mL distilled water	100 mL distilled Water	- autoclave separately
1 mL ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.7 g FeSO ₄ · 7H ₂ O	- let cool down
2 mL MnSO ₄ · 4H ₂ O	0.4 g EDTA	- pool together
5 mL H ₃ BO ₃		
5 mL Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O		
5 mL Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O		
1 mL CuSO ₄ · 5H ₂ O		
0.4 g EDTA		

Modifié de Aiba, S. & Ogawa, T. (1977): Assessment of growth yield of a blue-green alga: *Spirulina platensis*, in axenic and continuous culture. J. Gen. Microbiol. 1977, 102: 179-182.

Annexe 3: Milieux de culture des microalgues d'eau douce

Milieu 1: Milieu de culture pour Chlorelle (BBM)

A chaque formule 1ml des solutions B1 à B7 ont été ajoutés (Tableau 6).

Tableau 8: Solutions stock sans NPK pour la préparation des formules équivalentes à BBM

N° solution	Composition	M (g/mol)	Masse (g)	Vol. préparé (l)	g/l
B1	CaCl ₂ 2H ₂ O	146,99	1	0,04	25
B2	MgSO ₄ 7H ₂ O	246,37	3	0,04	75
B3	NaCl	58,45	1	0,04	25
B4	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	287,56	8,82	1	8,82

	MnCl ₂ ,4H ₂ O	162,39	1,44	1	1,44
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	1235,85	0,644	1	0,644
	CuSO ₄ , 5H ₂ O	249,50	1,57	1	1,57
	CoCl ₂ ,6H ₂ O	237,93	0,4	1	0,4
B5	H ₃ BO ₃	61,80	1,142	0,1	11,42
B6	EDTA	372,24	5	0,1	50
B7	FeSO ₄ , 7H ₂ O	278,05	0,498	0,1	4,98
	H ₂ SO ₄ (en ml)	98,08	0,1	0,1	1,80

Milieu 2: Milieu de culture BG-11 (ALLEN et STANIER, 1968)

<i>9 solutions stocks (autoclavage 121°C)</i>		<i>en g/L</i>	<i>Pour Préparer 1 litre de BG11</i>	
			<i>N° solution stock</i>	<i>volume en mL/L</i>
1	NaNO ₃	15		
2	K ₂ HPO ₄ ,3H ₂ O	4	1	100
3	MgSO ₄ ,7H ₂ O	7.5	2	10
4	CaCl ₂ ,2H ₂ O	3.6	3	10
5	Acide Citrique	0.6	4	10
6	Ammonium Ferric Citrate	0.6	5	10
7	EDTA (disodique, Mg ²⁺)	0.1	6	10
8	Na ₂ CO ₃	2	7	10
			8	10

			9	1
			QSP 1L, pH 7,1 autoclavage	
	Trace metal solution :			
	H3BO3	2.86		
	MnCl2, 4H2O	1.81		
9	Zn SO4,7H2O	0.22		
	Na2MOO4, 2H2O	0.39		
	CuSO4,5H2O	0.05		
	CO(NO3)2,6H2O	0.08		

**

Articles :