L'ALGUE ROUGE *GRACILARIA VERRUCOSA* (Hudson) Papenfuss DE LA LAGUNE DE BIZERTE (TUNISIE SEPTENTRIONALE) : ESSAI DE CULTURE EN MODE SUSPENDU ET COMPOSITION BIOCHIMIQUE

Fethi MENSI[1], J. KSOURI[1], W. HAMMAMI[1] et M.S. ROMDHANE[2]

[1] *Institut National des Sciences et Technologies de la Mer, Laboratoire de biodiversité et biotechnologies marine, 29 Rue Géneral Kheireddine 2015 Le Kram, Tunisie.*

[2] *Institut National Agronomique de Tunisie, Unité de recherche Ecosystèmes et Ressources Aquatiques, 43 av. Charles Nicolle 1082 Tunis. Tunisie*

ملخص

الطّحلب الأحمر غراسيلاريا ببحيرة بنزرت (شمال تونس): الإستزراع بطريقة التدلّي ودراسة التركيبة البيوكميائية: تم استزراع الطحلب الأحمر غراسيلاريا بطريقة التّدلي وذلك بعدّة مواقع وأعماق يمثلون الاختلافات البيوجيوكيمائية لبحيرة بنزرت خلال ربيع سنة 2009. تم تحديد التركيز وتوزيع المغذيات (الآزوت و الفسفور) من جهة وتحديد درجة الملوحة والحرارة ونسبة الأكسيجين الذائب بالماء وصفاء الماء من جهة أخرى، وذلك باستعمال الطّرق التحليلية الموحّدة دوليّا. خلال هذه الدراسة تم تحديد نمو الطحلب وكمية البروتينات والسكريات وصبغ R-phycoérythrine.يمكن أن نستخلص من خلال هذه الدّراسة أن نموّ طحلب الغراسيلاريا مماثل في كل المواقع. كما أن هذا النموّ في الأعماق التي لا تتجاوز المتر عن سطح الماء أقل من النموّ في الأعماق التي تتجاوز المتر وذلك لمحدودية كميّة الضوء. وكما بيّنت هذه الدّراسة أنهذا الطحلب يحتوي على نسب عالية من البروتينات (20– 30%) وصبغ R-phycoérythrine (50 – 80 مغ/غ مادّة رطبة) ونسبة منخفضة من السكريات (30 – 35 %). إنّ نسبة البروتينيات والصبغ المتحصّل عليها تجعل من طحلب الغراسيلاريا مادة خام لاستخلاص صبغ R-phycoérythrine ذات القيمة المضافة العالية.

الكلمات المفاتيح : غراسيلاريا، بحيرة بنزرت، استزراع، نمو، بروتينيات.

RÉSUMÉ

L'algue rouge, *Gracilaria verrucosa*, a été cultivée, durant le printemps 2009, en mode suspendu à différents emplacements et profondeurs représentant les différences biogéochimiques de la lagune de Bizerte au Nord de la Tunisie. La concentration et la distribution des nutriments (ammonium, phosphate) dans l'eau, ainsi que la salinité, la température, l'oxygène et la transparence de l'eau ont été déterminées. Les méthodes analytiques internationales standardisées ont été appliquées. Les effets du mode de culture, de l'emplacement et de la profondeur sur les rendements en poids, protéines, R-Phycoérythrine et sucres totaux de l'algue ont été étudiés. La croissance de *Gracilaria* a été similaire dans les différents sites mais plus lente dans les profondeurs supérieures à 1 m en raison d'une moindre intensité lumineuse. L'espèce étudiée contient des teneurs élevées en protéines (20-30%) et en R-phycoérythrine (50-85mg/g matière fraîche) et une faible teneur de carbohydrates (30%-35%). Les teneurs en protéines et R-phycoérythrine corroborent le potentiel d'utilisation de cette algue, pour l'extraction de molécules à haute valeur ajoutée et le développement d'activités innovantes.

Mots clés : *Gracilaria verrucosa*, Lagune de Bizerte, culture suspendue, Croissance, protéines, R-phycoérythrine

ABSTRACT

The red algae *Gracilaria verrucosa* in Bizerte lagoon (North of Tunisia) : Suspended culture and biochemical composition: The red alga, *Gracilaria verrucosa*, was grown using suspended modes at different depths and sites representing the biogeochemical differences of the Bizerte lagoon in the North of Tunisia during a spring 2009. The concentration and distribution of nutrients (ammonium, phosphate) in water, as well as the salinity, temperature and dissolved oxygen were determined. During this period some parameters as growth, concentrations of proteins, carbohydrates and pigments yield were investigated in order to evaluate the influence of the culture mode, site and depth on *Gracilaria* production. Internationally standardized analytical methods were applied in order to reach these objectives. Similar growth was observed in the lagoon. Gracilaria grew slower at a depths superior to 1.0 m. The major limiting factor of algae growth was found to be the light intensity. The results indicated that Gracilaria verrucosa showed a high range of protein (20%-30%), R-phycoerythrin contents (50-85mg/g weigh matter) and a low content in carbohydrate (30%-35%).The proteins and R-phycoerythrin contents corroborate the potential use of the studied algae, which constitute useful raw material for the development of R-phycoerythrin extraction activity.

Keys words: *Gracilaria verrucosa*, Bizerte lagoon, suspended farming, growth, proteins, R-phycoerythrin

INTRODUCTION

Il y a une demande croissante sur les algues rouges appartenant notamment au genre *Gracilaria* en raison de leur importance économique essentiellement pour la production de l'agar. Les Gracilaires contribuent à plus de la moitié dans la production mondiale d'agar (Fletcher, 1995). *Gracilaria verrucosa* fait partie de la flore de la lagune de Bizerte et ses populations couvrant 9 % de la superficie. Elle génère une biomasse totale estimée à 573 tonnes en poids sec par an (Ksouri et Ben Said, 1998). Ce rendement des populations naturelles est jugé faible pour le démarrage d'une activité industrielle ; le recours à la culture de cette espèce est donc une opportunité pour augmenter les rendements.

Dans le monde, les techniques de culture de *Gracilaria* sont actuellement bien maîtrisées. En vu de déterminer la faisabilité d'un système de culture de *Gracilaria* dans la lagune de Bizerte, des études ont été effectuées pour optimiser les rendements (Ksouri et *al.,*1999 ; 2000 ; 2006). Le mode de culture par la corde tendue sur le substrat avec des touffes ayant un poids moyen initial de 200 g donne le meilleur rendement. Cependant, une telle technique, n'est applicable que dans des zones d'une profondeur inférieure à 2 m correspondant à seulement 10 % de la superficie de la lagune. Cette technique reste limitée d'autant que *Gracilaria* ne supporte pas la compétition avec les espèces nitrophiles, essentiellemnt *Ulva rigida* et *Chaetomorpha linum*. De même, du point de vue environnemental, les systèmes suspendus d'exploitation n'emprisonnent pas le sédiment comme c'est le cas pour les cultures sur substrat, qui entraînent la modification du sédiment (Troell et *al.,* 1997).

L'essai d'une technique de culture en mode suspendu pourrait conduire à des résultats plus concluants et éviter les contraintes entravant les rendements. Cette technique, utilisée avec succès en mer (Dawes, 1995), ne cesse de se développer grâce au nouveau concept d'aquaculture intégrée poissons, moules et algues (Buschmann et *al.,* 2008 ; Abreu et *al.,* 2009 ; Troell et *al.,* 2009). L'introduction et la réussite d'un tel mode de culture dans un milieu lagunaire dépendraient étroitement des conditions biogéochimiques des sites de culture ; lesquelles affectent la croissance et la composition chimique de l'algue.

Dans la présente étude, nous avons adopté un nouveau modèle de culture en mode suspendu composé de plusieurs étages sous forme de cerceaux liés entre eux par des cordes et des filets et placés à différents niveaux de la colonne d'eau. Les rendements d'un tel système de culture ont été comparés à ceux d'une culture horizontale (corde tendue sur le substrat). Nous avons aussi analysé la qualité biochimique de l'algue, paramètre déterminant sa valorisation. Les méthodes ont été mises au point dans le but de répondre aux diverses problématiques soulevées pour une exploitation durable de la culture de *Gracilaria verrucosa* dans la lagune de Bizerte. Le choix du mode de culture et du site, les modalités et les fréquences d'échantillonnage visent le développement d'une technique de culture verticale permettant une meilleure exploitation de la colonne d'eau.

MATERIEL ET METHODES

Modalités de Culture

Site de l'étude

La lagune de Bizerte est située sur la côte nord de la Tunisie (37°8'- 37°14'N, 9°48'- 9°56'E). Elle a une superficie de 150 km^2 et une profondeur moyenne de 8 m. Elle communique au Nord avec la mer Méditerranée par un canal de 12 m de profondeur et de 7 km de longueur et à l'Ouest avec le lac Ichkeul par l'oued Tinja qui l'alimente en eau douce de façon irrégulière. L'apport marin est fort en été, avec une circulation anticyclonique dans la lagune (Harzallah, 2003). Les vents dominants du Nord-ouest constituent le principal facteur forçant, puisque les marées sont négligeables (Mansouri, 1996). De même, la lagune constitue un bassin récepteur d'un réseau hydrographique intense drainant un bassin versant de plus de 424 $km^{2.}$

Emplacement des cultures

Pour l'installation des unités expérimentales, nous avons sélectionné trois stations en tenant compte de la facilité d'accès et de surveillance, de la profondeur de l'eau (4 à 7 m) et de la position d'emplacement par rapport à la circulation d'eau dans le lac.

Les stations sélectionnées sont les suivantes :

- A : Menzel Jemil (près de tables conchylicoles de la Société Tunisie Lagunes)
- B : Menzel Abderahman (Tunisie Cultimer)
- C : Jouaouda (Ferme Marine des Bivalves)

Pour chaque station, il y a un site pour les cultures en mode suspendu (A1,B1 et C1) à l'intérieur de la lagune et un site témoin pour les cultures sur substrat (A0, B0 et C0) situé près du rivage (figure 1) . Les coordonnées géographiques des différentes stations de culture sont les suivantes : A0 (37° 13.391'), B0 (37° 13.706'), C0 (37° 09.00'),A1 (37°13.00'), B1 (37°13.00') et C1 (37°09.500').

Modèle de culture

Le modèle d'expérimentation (figure 2) est inspiré de celui du verveux utilisé dans la pêche artisanale en Tunisie. En effet, il s'agit d'un filet de 6 mm de maille soutenu par des cerceaux de 80 cm de diamètre et espacés de 30 cm. Les cerceaux, en fer galvanisé de 6 mm de diamètre, sont à leur tour couverts par le même type de filet et forment ainsi des séparations utilisées pour fixer les touffes de l'algue à l'aide de.

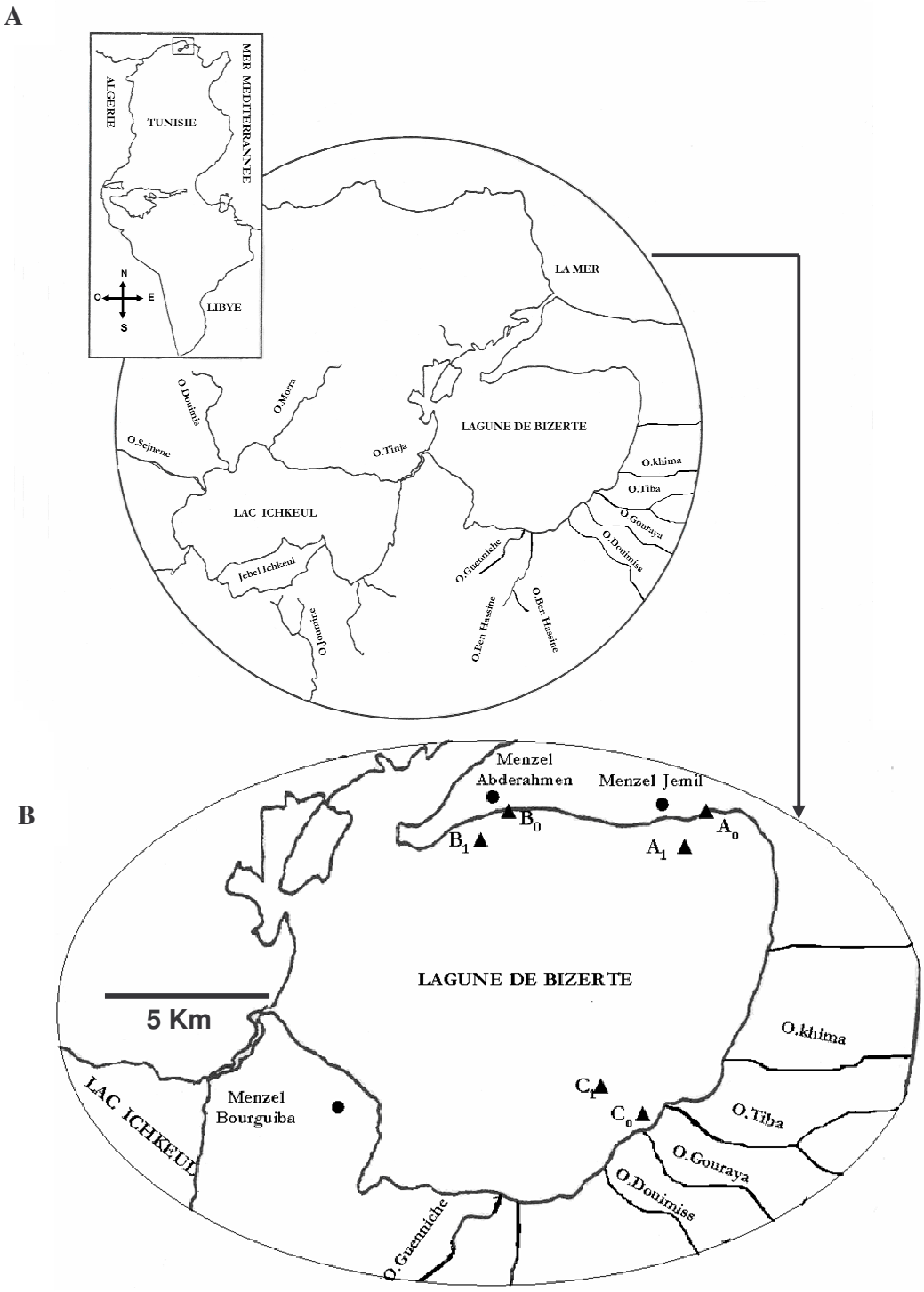

Figure 1: Délimitation de la lagune de Bizerte et de son bassin versant (A) et emplacements des stations cultures (B).

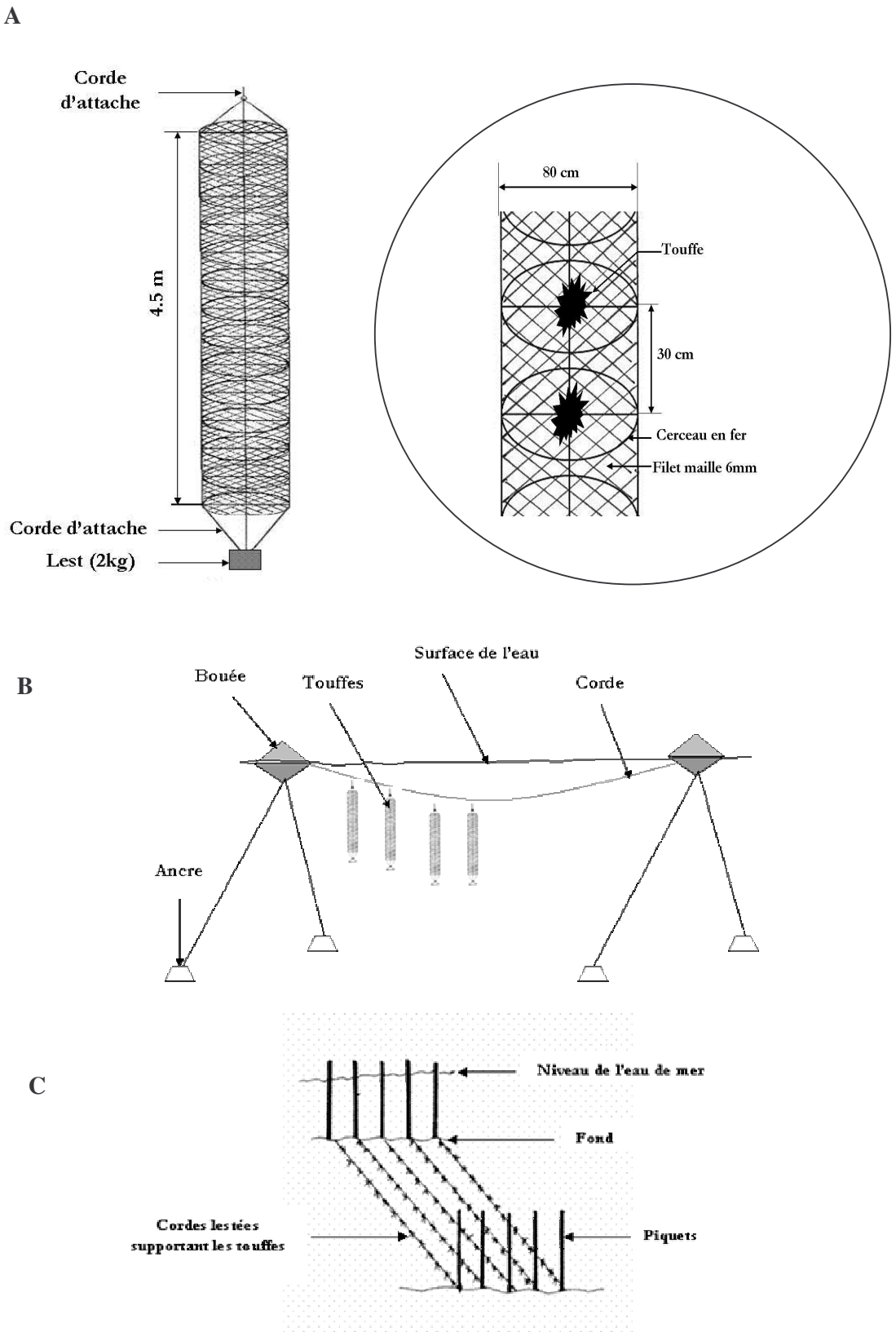

Figure 2: Culture des touffes de *Gracilaria verrucosa* dans la lagune de Bizerte : en mode suspendue (A), sur un système de long line (B) et sur substrat (C).

cordelettes. L'unité, d'une longueur de 4 m, comporte 15 cerceaux. Afin de maintenir l'unité en position verticale dans l'eau, des lests ont été placés à son extrémité inférieure. Chargée des touffes, l'unité est alors accrochée sur un long line flottant utilisé pour la culture des moules.

Dans le développement de notre modèle, nous avons misé sur l'optimisation de l'efficacité technique du modèle et de son coût de fabrication. Un investissement trop élevé représente une contrainte sérieuse pour l'introduction de la culture de *Gracilaria* dans la lagune. Ainsi, l'utilisation de matériaux locaux et bon marché est d'une grande importance.

Choix et installation des touffes

Plusieurs précautions ont été prises pour assurer l'homogénéité du poids et de la qualité des thalles. Pour le poids, nous avons utilisé une balance de terrain avec une précision de 0.1 g. Les touffes ont été choisies de même couleur, au même stade du cycle de développement (thalles carposporophytes et élimination des thalles gamétophytes) et ayant un rapport surface/volume voisin, et ce en choisissant des thalles ayant des longueurs et des ramifications similaires. Ceci a été fait dans une optique de minimiser le coefficient de variations de nos unités expérimentales en se basant sur le modèle proposé par Hanisak , (1990). Pour garantir une homogénéité maximale des touffes, celles-ci ont été collectées, triées puis stockées durant 15 jours à une profondeur de 1 m dans des enclos sur le lieu d'expérience. Ensuite, les touffes, sont pesées. Chaque touffe de 200 g est attachée par un fil tressé au filet tapissant le cerceau. Les unités ainsi que les cerceaux sont numérotés pour que chaque touffe constitue une unité expérimentale. Tous les quatre cerceaux ont été considérés comme étant un niveau ; ce qui nous donne pour chaque station 16 touffes par niveau et quatre unité par station

Suivi de la croissance

Afin de quantifier la croissance, les poids des touffes ont été enregistrés au début et à la fin de l'expérience (printemps 2009) pour calculer la productivité de *Gracilaria verrucosa* par unité de surface.

Mesures environnementales

Profondeur de Secchi

Le disque de Secchi, de 30 cm de diamètre et d'un poids de 3 kg, est divisé en quatre parties, peintes alternativement en noir et blanc. Le disque est attaché à une corde comportant des marques tous les 50 cm. Les mesures de la profondeur de secchi ont été faites par la même personne, à la même période de la journée selon les recommandations de Preisendorfer (1986).

Température et Salinité

Pour les différentes profondeurs, les mesures de la température (thermomètre portatif) et de la salinité (salinomètre) sont effectuées durant la période de l'expérience, à la même heure. A chaque profondeur, l'eau est collectée à l'aide d'une bouteille de renversement de Van Dorn (capacité environ 31). Les mesures sont faites sur le terrain selon les recommandations de Fonseca (1990).

Dosage des nutriments

Pour les nutriments dissous, on utilise l'eau filtrée sur GF/C. Les échantillons d'eau sont conditionnés sur place et placés dans des flacons en PVC de 100 ml. Trois flacons sont fixés avec 0,5 ml d'H_2SO_4 (4N) pour le dosage de l'azote et du phosphore. Les dosages de l'ammonium et de l'orthophosphate ont été effectués au laboratoire afin d'évaluer correctement les potentialités de croissance des algues; la connaissance des teneurs en nutriments essentiels étant indispensable. L'ammonium est déterminé selon la méthode de Solorzano (1969) et l'orthophosphate selon celle de Murphy et Riley (1962).

Extraction et dosage des protéines, de la R-Phycoérythrine et des sucres

Extraction

L'extraction de la R-Phycoérythrine (RPE) génère d'autres protéines ainsi que des polysaccharides que nous essayons de quantifier. Nous avons eu recours aux procédés de l'hydrolyse enzymatique pour optimiser l'extraction des protéines (Fleurence et *al.,* 1995).

Dosage

Protéines

Les protéines ont été dosées selon la méthode de Bradford (1976) qui repose sur un dosage colorimétrique basé sur le changement d'absorbance (la mesure se fait à 595 nm) se manifestant par le changement de la couleur du bleu de Comassie après complexation avec les acides aminées aromatiques (tryptophane, tryosine et phénylalanine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans la ou les protéines. La forme anionique (liée) du colorant est bleue et possède un spectre d'absorption maximal estimé à 595 nm. Les formes cationiques (libres) du colorant sont rouges et vertes, absorbant à 465 – 470 nm. Le changement d'absorbance est proportionnel à la qualité du colorant lié et indique la concentration en protéines de l'échantillon.

Dans un tube à hémolyse contenant 0,100 ml de l'échantillon à doser, on ajoute 2 ml de réactif au bleu de Coomassie et on mélange le tout; après 5 min, on lit les absorbances à 612 nm contre un réactif témoin. Une courbe d'étalonnage est établie a partir d'une solution étalon de BSA (mg/ml). Pour cela, 10 solutions étalons de concentrations allant de 0 à 2,0 mg/ml ont été préparées. L'eau physiologique a été utilisée comme diluant. L'absorbance de chaque concentration a été déterminée et une courbe d'étalonnage a été établie. La quantité de protéines Q (mg) que renferme chaque échantillon est déterminée selon l'équation suivante : $Q= 0.1*20*C$. C étant la concentration de protéines de l'échantillon, dégagée à partir de la courbe d'étalonnage.

R-phycoérythrine

Les teneurs de la R-phycoérythrine des différents échantillons sont estimées par mesure de l'absorbance à 565 nm, longueur d'onde du maximum d'absorption de la phycoérythrine. Par ailleurs, les spectres d'absorbance entre 450 nm et 600 nm de la phycoérythrine ont été également établis. La loi de Beer-Lambert établit l'absorbance à 565 nm par la formule suivante :

$$A=\varepsilon*I.*C1 = \varepsilon*I.*C2 \ / PM$$

Avec

$$C2=A*260.000/(2.106)=0.13*A$$

A : absorbance à 565 nm

ε : coefficient d'extinction molaire de la R-phycoérythrine

l : longueur du trajet optique = 1 cm

C1 : concentration molaire en phycoérythrine (M)

C2 : concentration massique en R-phycoérythrine (mg/ml)

PM : poids moléculaire de la R-phycoérythrine

Dosage des sucres totaux

Pour doser les sucres totaux dans les échantillons de *Gracilaria verrucosa,* nous avons appliqué la méthode de Dubois *et al.* (1956). En présence de l'acide sulfurique et à chaud, les glucides sont déshydratés en dérivés du furfural qui se combinent facilement avec le phénol et donnent une coloration rose-saumon (le glucose fournit de l'hydroxyfurfural). L'absorbance est lue à la longueur d'onde de 490 nm. La coloration est permanente. Cette méthode permet de détecter des quantités de glucides pouvant atteindre 1 µg. Pour chaque échantillon d'algue, nous avons procédé de la manière suivante : à 1ml de phénol à 5% w/v (5 g de phénol dans 100 ml d'eau distillée glacée), 1 ml d'échantillon est ajouté. Le tout est homogénéisé par un vortex. Ensuite, on ajoute 5 ml de H_2SO_4 concentré. L'ensemble est incubé dans un bain marie à 100°C pendant 5 mn. A la sortie du bain marie, l'échantillon est stocké pendant 30 mn à l'obscurité. Ensuite, la lecture de l'absorbance de l'échantillon, à la longueur d'onde 490 nm, est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre (JANWAY 6405,UK).

Pour déterminer la courbe d'étalonnage, dix solutions étalons de concentration allant de 0 à 70 mg/ml ont été préparées à partir d'une solution étalon de fructose (w/v), (1 ml pour chaque solution) ; l'eau physiologique est utilisée comme diluant. L'absorbance de chaque concentration étant déterminée, la courbe d'étalonnage est ensuite établie. La quantité de sucres Q (mg) que renferme chaque échantillon est déterminée selon l'équation suivante : Q = 1*20*C. C étant la concentration de sucres de l'échantillon, dégagée à partir de la courbe d'étalonnage.

Analyse statistique

Tous les résultats sont exprimés par une moyenne ± l'écart type. Après vérification préalable de l'homogénéité des variances et de la normalité des données, les résultats relatifs aux teneurs en protéines, R-phycoérythrine et sucres totaux ont été soumis à une analyse de la variance à deux facteurs (ANOVA) selon la procédure GLM du logiciel Statistica version 5.1 (Statsoft, Tulsa, USA). Lorsque l'ANOVA se révélait significative, le test de Duncan a été utilisé pour la comparaison des moyennes ; le seuil de signification de 5 % est retenu. Les facteurs étudiés sont le site d'étude, la profondeur de culture et leurs interactions. Le test t de Student (Schwartz, 1983) a été utilisé afin de comparer les moyennes concernant le poids final des touffes, les paramètres physiques (transparence de l'eau, température, oxygène dissous et salinité) et les paramètres chimiques (ammonium et orthophosphates).

RESULTATS

Croissance

La variation de la croissance pondérale de *Gracilaria verrucosa* est mise en relief par la figure 3. Au terme de la période de culture (35 j), le poids des touffes, initialement de 200 g, a varié, pour les deux modes de cultures, de 380 à 480 g. Pour la culture en mode suspendu, les poids moyens les plus élevés sont enregistrés à une profondeur de 1 m et ce dans les différentes stations. Pour la culture sur corde tendue, ces poids sont notés dans les stations A et C uniquement ($p < 0.001$). Les poids moyens enregistrés à 2, 3 et 4 m de profondeur sont homogènes pour les différentes stations. Le poids le plus faible a été enregistré pour la culture sur les rivages dans la station B

Paramètres physico-chimiques

Au cours de la période d'étude, la variation des valeurs des paramètres physiques et chimiques est illustrée dans le tableau I. Comme l'analyse statistique montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les stations ($p > 0.01$), nous présentons un état global donnant les valeurs moyennes des différents paramètres aux différentes profondeurs. L'ensemble du plan d'eau présente une grande homogénéité, tant sur le plan horizontal que vertical ce qui implique l'absence de stratification.

Quant à la transparence de l'eau, la profondeur de Secchi (m) dans les différentes stations (A, B et C) a été respectivement de 3.6, 2.8 et 2.6 m.

Composition biochimique de l'algue

Suite à un incident de terrain en fin de l'expérience, nous avons perdu les échantillons de la station B ; l'étude de la composition biochimique à intéressé des échantillons des stations A et C.

Les résultats des analyses ANOVA appliquées ainsi que les valeurs moyennes de la composition

biochimique de l'algue (teneur en protéines, R-Phycoérythrine et sucres totaux) sont résumés dans les tableaux II et III

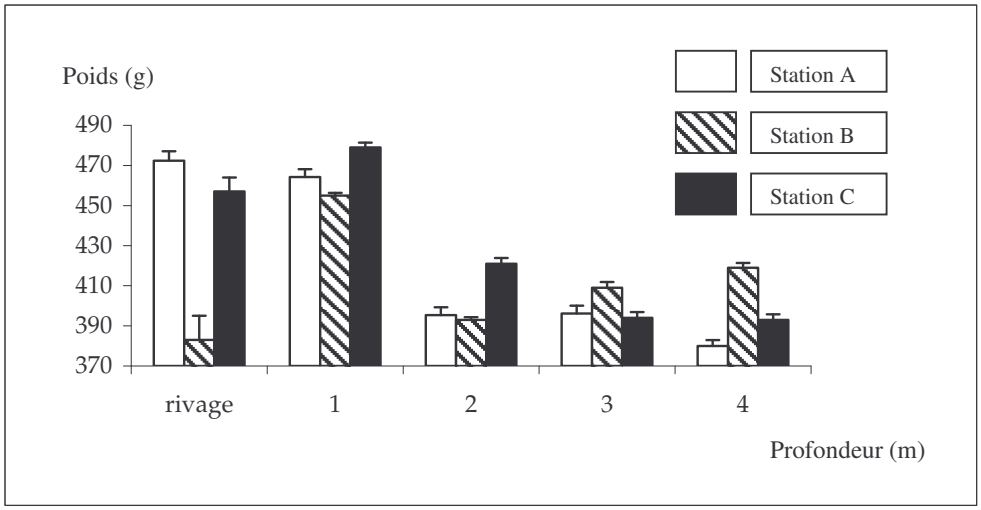

Figure 3 : Poids final (g± se), dans les différentes stations et profondeurs.

Tableau I : Valeurs moyennes des paramètres physico-chimiques dans les différentes profondeurs (n=15).

	Profondeurs				
	Rivages	1 m	2 m	3 m	4 m
Paramètres					
Température (°C)	20.26±4.12	20.25±4.81	19.86±4.53	19.78±4.18	19.87±4.35
Salinité (‰)	33.49±3.36	33.93±2.99	34.00±2.79	34.08±2.49	34.25±2.52
Oxygène (mg/l)	6.92±1.07	5.81±1.21	5.78±1.10	6.17±0.25	5.75±1.06
Ammonium (mg/l)	0.13±0.09	0.13±0.06	0.13±0.07	0.12±0.07	0.12±0.08
Orthophosphates (mg/l)	2.13±3.87	1.00±1.75	1.05±1.56	1.05±1.98	2.10±3.19

Tableau II. Résumé de l'ANOVA testant l'effet de la station et de la profondeur de culture de *Gracilaria verrucosa* sur sa composition biochimique. Le seuil de signification est de 5%.

	Dl effet	Dl erreur	F	p	R^2
Protéines					
Site	1	80	8.73	<0.05	
Profondeur	4	80	42.71	<0.001	0.80
Site X Profondeur	4	80	26.62	<0.001	
R-phycoérythrine					
Site	1	136	1.51	<0.001	
Profondeur	1	136	0.06	<0.001	0.81
Site X Profondeur	4	136	0.97	<0.001	
Sucres totaux					
Site	1	90	0.1	>0.05	
Profondeur	1	90	68.5	<0.001	0.81
Site X Profondeur	4	90	26.2	<0.001	

Tableau III : Composition biochimique de *Gracilaria verrucosa* cultivée dans différentes stations et profondeurs.

	Station A					Station C				
Profondeur (m)	**rivage**	**1**	**2**	**3**	**4**	**rivage**	**1**	**2**	**3**	**4**
Variables										
Protéines (mg/g)	**296 ^{de}+ 7.09**	**216^{ab}+6.14**	**252^{c}+5.49**	**214^{a}+5.49**	**260^{c}+5.48**	**302^{e}+7.09**	**233^{b}+5.49**	**210^{a}+5.50**	**284^{d}+5.48**	**2.66^{c}+5.51**
RPE (mg/g)	**0.86^{f}+0.03**	**0.79^{ef}+0.03**	**0.84^{f}+0.03**	**0.44^{bc}+0.03**	**0.45^{c}+0.03**	**0.41^{abc}+0.03**	**0.35^{ab}+0.03**	**0.33^{a}+0.03**	**0.72^{e}+0.03**	**0.55^{d}+0.03**
Sucres totaux (%)	**34.10^{f}+0.15**	**32.67^{cd}+0.15**	**33.61^{e}+0.15**	**31.84^{ab}+0.15**	**32.19^{bc}+0.15**	**34.95^{g}+0.15**	**32.61^{cd}+0.15**	**31.68^{a}+0.15**	**32.57^{cd}+0.15**	**32.74^{d}+0.15**

Pour chaque variable, les moyennes + ESD, affectées par des lettres différentes, sont significativement différentes ($p< 0.05$), test de Duncans

Protéines

La quantité de protéines produites a varié entre 216 et 302 mg/g d'algue. Les valeurs les plus faibles ont été enregistrées dans les deux stations à une profondeur de 1 m de la surface de l'eau. L'analyse statistique montre un effet hautement significatif ($p<0.001$) d'une part du site et de la profondeur et d'autre part de l'interaction entre ces deux facteurs. Une corrélation positive est décelée entre la concentration des protéines des thalles de *Gracilaria* et la profondeur. En effet, quand la profondeur augmente la concentration en protéines augmente, mais non pas de la même manière dans les deux stations.

R-Phycoérythrine

La quantité moyenne de R-Phycoérythrine, produite après 35 jours de culture a varié entre 0.33 et 0.86 mg/g d'algue. L'analyse de la variance montre qu'il y a un effet significatif ($p<0.001$) de la profondeur, de la station et de l'interaction entre la profondeur et la station. On remarque qu'il y a une corrélation positive entre la teneur en RPE et la profondeur dans la station C et négative dans la station A. La quantité de RPE obtenue avec le mode de culture de la corde tendue et à des profondeurs de 1 et 2 m pour le mode de culture suspendu, est nettement supérieure dans la station A ; elle est le double de celle de la station C ($p < 0.001$). Pour le mode suspendu, les concentrations de RPE, trouvées aux profondeurs de 3 et 4 m de la station C, sont supérieures à celles de la station A.

Sucres totaux

L'analyse de la variance montre qu'il y a un effet significatif ($p < 0.001$) de la profondeur et de l'interaction entre la profondeur et la station. La teneur la plus élevée a été enregistrée dans les deux stations pour la culture sur corde tendue sur les rivages (34 et 35 % pour les stations A et C respectivement) alors que les teneurs les plus faibles ont été enregistrées à une profondeur de 3 m pour la station A et à une profondeur de 2 m pour la station C. On remarque qu'il n'y a pas de relation de variation claire entre la teneur en sucres et la profondeur.

DISCUSSION

Dans le milieu naturel, la culture de *Gracilaria verrucosa,* généralement horizontale, se fait directement sur le substrat ou sur des structures flottantes. Dans ce cas, les thalles entiers sont insérés sur des cordes linéaires et étirées entre des pieux enfoncés dans le fond (Dawes, 1995). De même, un système de radeau est aussi utilisé. Les radeaux sont soit flottants avec des cordages suspendus portant les boutures tous les 10 cm, soit fixés entre deux eaux auquel cas, les cordages portant les boutures sont horizontaux (Guo-zhong et *al.,* 1984). Dans la lagune de Bizerte, cette dernière technique s'est soldée par un échec (Ksouri et *al.,* 1999). Ceci a été attribué aux faits que les thalles de *Gracilaria verrucosa*, étant fragiles, se détachent de la corde, sous l'effet des mouvements de l'eau. Le système de culture que nous avons adopté permet de pallier à de telles difficultés étant donné que les touffes sont attachées sur la surface des cerceaux, formée d'une maille fine de filet. Ainsi, nous n'avons pas noté de pertes de touffes durant la période d'expérimentation. À l'inverse du modèle proposé par Troell et *al.,* (1997), utilisant le filet tapissant le cerceau pour insérer plusieurs touffes, notre système comporte une seule touffe par cerceau ceci permet la pénétration de la lumière pour les touffes de l'étage inférieur. Dans notre cas, la densité de culture, initialement de 3.48 kgm^{-2}, a atteint en 35 jours, 7.2 kgm^{-2} engendrant un facteur de multiplication de 2.06 se situant dans la fourchette des valeurs signalées par d'autres auteurs (tableau IV).

Tableau IV : Productivité de l'espèce *Gracilara* cultivée en mode suspendu

DI* (kgm^{-2})	DF* (kgm^{-2})	Rapport DF/DI	Espèce	Temps de culture (j)	Référence
0.62	1.34	*2.16*	*Gracilaria chilensis*	35 (mer)	Halling et *al.,*(2005)
0.550	3.50	*6.36*	*Gracilaria lemaneiformis*	26 (mer)	Yang et *al.,*(2006)
0.55	1.120	2.03	*Gracilaria chilensis*	20 (mer)	Troell et *al.,*(1997)
1.2	2.4	2	*Gracilaria chilensis*	60 (mer)	Westermeier et *al.,*(1993)
8	9.6	1.2	*Gracilaria caudata*	30 (mer)	Morinho-Soriano et *al.,*(2009)
3.48	7.2	*2.06*	*Gracilaria verrucosa*	35 (lagune)	**Présent travail**

***DI** : Densité initiale ; **DF** : Densité finale

Dans chaque station, la profondeur de l'eau a eu un effet sur la croissance et le rendement de *Gracilaria*. Ainsi, les rendements les plus élevés ont été obtenus dans les profondeurs qui ne dépassent pas un mètre à partir de la surface. Il paraît que dans la lagune de Bizerte la quantité de lumière reçue à un mètre de profondeur est l'optimum pour la croissance de *Gracilaria verrucosa.* Etant donné la forte turbidité dans la lagune, la profondeur de Secchi ne dépasse pas 4 m. Ceci est en accord avec les observations de Kaladharan et *al.,* (1996) qui indiquent que dans des milieux plus clairs et à un mètre de profondeur la croissance de *Gracilaria verrucosa* est affectée par les effets nuisibles de l'illumination intense et de la dessication des frondes pendant la basse marée. Ainsi, au delà d'un mètre de profondeur, la limitation de la croissance pourrait être due à une moindre disponibilité de la lumière. Dans les milieux turbides, le coefficient d'atténuation de la lumière est faible. S'ajoute à ce fait le colmatage des filets par la matière en suspension qui s'y dépose.

La température, la salinité et la teneur en oxygène de l'eau sont également des facteurs importants qui déterminent la production de *Gracilaria*. La plupart des espèces de *Gracilaria* se développent bien quand la température est de 20 °C ou plus, que la salinité est comprise entre 25 et 33 ‰ et que le milieu est bien aéré (Bird, 1988; Choil et *al.,* 2006). Dans nos expériences, *Grcilaria verrucosa* s'est bien développée parce que les périodes de culture ont été favorables (températures 20°C, salinités 34‰ et oxygène 6 mg/l). De surcoît, les niveaux nutritifs (ammonium et orthophosphates) élevés permettent au *Gracilaria verrucosa* de la lagune de Bizerte d'exprimer son potentiel de croissance. Des taux de croissances faibles ont été rapportées par Anderson et *al.,*(1996) dans un milieu pauvre en ammonium (< 0.01 mg/l) et pourvu d'un faible mouvement d'eau.

La comparaison entre les deux modes de culture a montré que la culture en mode suspendu est plus avantageuse par rapport au mode de culture sur le substrat. Si nous tenons compte du faible taux de récupération des touffes pour le mode de culture sur le substrat (70 % dans notre cas), ce mode de culture aboutit à un rendement de 28 t/ha. Le risque de pertes de touffes est un problème majeur auquel se heurte la culture de *Gracilaria* sur le substrat. Ces pertes sont liées à des difficultés d'insertion des touffes sur les cordes (Ksouri et *al.,* 1999), à l'epiphytisme (Fletcher, 1995) et à la faune associée contenant plusieurs groupes zoologiques exploitant le genre Gracilaria comme source de nourriture préférée (Anderson et *al.,* 1998 ; Smit et *al.,* 2003 et Hansen et *al.,* 2006). Pour le mode suspendu, étant donnée que le taux de récupération avoisine les 100 %, le rendement est de 72 tonnes/ha. Le taux de récupération des touffes de *Gracilaria verrucosa* est élevé et atteint les 100%, aussi bien pour des cultures sur cordes (Westermeir et *al.,* 1993 ; Halling et *al.,* 2005 ; Abreu et *al.,* 2009) que pour des modèles (Torell et *al.,* 1997) similaires à celui utilisé dans le présent travail.

Les concentrations en protéines et carbohydrates des thalles de *Gracilaria verrucosa*, collectés dans les deux stations, sont proches de celles enregistrées dans une partie polluée da la lagune de Venise en Italie et signalées par Sfriso et *al.,* (1994) qui indiquent des valeurs de protéines comprises entre 26 et 30 % et des valeurs de carbohydrates ne dépassant pas les 35 %. Cependant, nos valeurs sont différentes de celles d'un milieu lagunaire peu pollué (Sfriso et *al.,* 1994) et de milieux ouverts pour d'autres espèces de *Gracilaria* (Morinho-Soriano et *al.,* 2006 ; Wen et *al.,* 2006 ; Ortiz et *al.,* 2009). Ces auteurs indiquent des valeurs de protéines comprises entre 11 et 22% et des teneurs en carbohydrates atteignant les 60 %. La variabilité entre les résultats pourrait être due à la teneur en ammonium du milieu. Cet élément a été signalé comme étant un facteur limitant très important ; il affecte positivement les concentrations en chlorophylle et en protéines et négativement la concentration en carbohydrates (Boulus et *al.,* 2007). Selon ces derniers auteurs, il y a une corrélation négative entre la concentration en carbohydrates et celle des protéines. La concentration maximale de protéines a été obtenue avec des concentrations maximales en ammonium et une intensité lumineuse élevée. Par contre, la concentration maximale en carbohydrates a été enregistrée avec de faibles concentrations en ammonium et intensité lumineuse.

Dans la lagune de Bizerte, la relation entre la teneur en R-phycoérythrine (RPE) et la profondeur n'est pas bien établie comme c'est le cas pour d'autres travaux (Gomèz et *al.,* 2005 ; Xu et Kunshan, 2008). En revanche, d'autres auteurs (Lapointe, 1981 ; Chopin et al., 1995; Gomèz et *al.,* 2005 ; Xu et Gao, 2008) ont montré que chez le genre *Gracilaria*, la teneur en RPE est corrélée positivement avec la profondeur de l'eau. Comme le coefficient d'atténuation de la lumière augmente en fonction de la profondeur, la quantité de lumière disponible devient de plus en plus faible. *Gracilaria* aurait montré une stratégie photobiologique qui permet à ces thalles de se développer dans des conditions de faibles lumières, tout en augmentant par photosynthèse le nombre de pigments (Gomez et *al.,* 2005). L'absence de corrélation entre la teneur en R-phycoérythrine de *Gracilaria verrucosa* et la profondeur de l'eau de la lagune pourrait être attribuée aux nombreux autres facteurs qui influencent la concentration de ce pigment tout au long de la colonne d'eau (température, salinité, nutriments et régime du courant d'eau). Selon Bird (1982), Jing-Wen et Shuang-lin (2001a) et Jing-Wen et Shuang-lin (2001b), la forme et la concentration de l'azote dans le milieu ainsi que l'interaction de cet élément avec la

lumière affectent les teneurs en R-phycoérythrine de certaines espèces de *Gracilaria*.

CONCLUSION

Le mode de culture suspendue selon le modèle que nous proposons a donné un meilleur résultat par rapport au mode de culture sur le substrat. Mais, si cette technique est efficace aussi pour le contrôle de l'épiphytisme, elle nécessite un nettoyage fréquent des filets en raison de leur colmatage excessif résultat d'une turbidité notable. Une étude technico-économique permettrait d'évaluer la rentabilité de cette technique.

Les valeurs relatives aux teneurs en protéines, R-phycoérythrine et carbohydrates sont influencées par les paramètres environnementaux. Et même si la composition biochimique de *Gracilaria verrucosa* indique que cette espèce est une source potentielle de protéines, des études notamment de digestibilité sont nécessaires pour évaluer sa valeur nutritive comme complément alimentaire. Les teneurs en R-phycoérythrine, étant élevées, permettent d'envisager le développement d'une activité d'extraction de ce pigment, très prisé pour des applications biotechnologiques.

Remerciements

Nous exprimons nos remerciements aux responsables et au personnel des sociétés exploitants la lagune pour l'élevage des moules (**Tunisie Lagunes**, **Tunisie Cultimer** et **Ferme Marine des Bivalves**) pour leur précieuse aide, l'accès à leur concession et pour nous avoir facilité le travail de terrain.

BIBLIOGRAPHIE

Abreu, M. H.; Varela, D. A.; Henríquez, L.; Villarroel, A.; Yarish, C; Sousa-Pinto I.; A. H. Buschmann. (2009).Traditional vs. Integrated Multi-Trophic Aquaculture of Gracilaria chilensis C. J. Bird, J. McLachlan & E. C. Oliveira: Productivity and physiological performance. Aquaculture, 293 : 211–220

Anderson, R. J.; Levitt G. J. et A. Share. (1996). Experimental investigations for the mariculture of *Gracilaria* in Saldanha Bay, South Africa. Journal ofApplied Phycology, 8: 421-430

Anderson, B.C.; Smit, A.J., J.J. Bolton. (1998).Differential grazing effects by isopods on *Gracilaria gracilis* and epiphytic *Ceramium diaphanum* in suspended raft culture. Aquaculture, 169 : 1998. 99–109

Bird, K.T. (1988). Agar production and quality from Gracilaria sp. Strain G-16: effects of environmental factors. Bot.mar., 31: 33 -39

Bird,K.T. (1982). Nitrogen allocation and storage patterns in Gracilaria Tikvahiae (Rhodophyta). Journal of Phycology, 18 : 344-348.

Boulus, A. ; Spaneir E. et M. Friedlander. (2007). Effect of outdoor conditions on growth rate and chemical composition of Gelidium crinale in culture. J. Appl. Phycol., 19: 471-478.

Bradford, M.M.(1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemstry, 72 : 248-254

Buschmann , A. H.; D. A. Varela ; M. C. Hernández-González et P. Huovinen. (2008). Opportunities and challenges for the development of an integrated seaweed-bsed aquaculture activity in Chile: determining the physiological capabilities of Macrocystis and Gracilaria as biofilters. Journal of Applied Phycolology, 20:571–577

Choi1, H.G.; Y.S. Kim; J.H. Kim; S.J. Lee; E.J. Park; J. Ryu et K.W. Nam. (2006). Effects of temperature and salinity on the growth of *Gracilaria verrucosa* and *G. chorda*, with the potential for mariculture in Korea. Journal of Applied phycology, 18:269-277

Chopin, T.; Gallant , T. et I. Davison. (1995). phosphorus and nitrogen nutrition in *chondrus crispus* (rhodophyta): effects on total phosphorus and nitrogen content, carrageenan production, and photosynthetic pigments and metabolism. J. Appl. Phycol.

Dawes,C.P. (1995). Suspended cultivation of *Graclaria* in the sea. Journal of Applied Phycology, 7: 303-313,

Dubois, M. (1956). Colorimetric Method for determination of Sugars and related Substances. Analytical chemistry, 28: 350-356

Fletcher, R. L.(1995). Epiphytism and fouling in *Gracilaria* cultivation: an overview. Journal of Applied Phycology, 7 : 325 - 333

Fleurence, J.; L. Massiani; O. Guyader et S. Mabeau. (1995). Use of enzymatic cell wall degradation for improvement of protein extraction from Chondrus crispus, Gracilaria verrucosa and Pabmaria palmate. Journal of Applied Phycology, 7: 393-397

Fonseca, M.S. (1990). Physical Measurements. pp. 139-1. *ln:* RC Phillips, CP McRoy (eds.) Seagrass Research Methods. UNESCO, Paris.

Gomez, I.; Figueroa, F. L.; Huovinen, P.; Ulloaa, N. et V. Morales.(2005). Photosynthesis of the red alga Gracilaria chilensis under natural solar radiation in an estuary in southern Chile. Aquaculture, 244 : 369– 382

Halling, C. ; Aroca, G.; Cifuentes, M. ; Buschmann A. H. et M. Troell. (2005). Comparison of spore inoculated and vegetative propagated cultivation methods of Gracilaria chilensis in

an integrated seaweed and fish cage culture. Aquaculture International, 13:409–422.

Hanisak, D.M. (1990). The use of Gracilaria tikvahiae (Gracilariales, Rhodophyta) as a model system to understand the nitrogen nutrition of cultured seaweeds. Hydrobiologia. 204/205 : 79-87, 1990.

Hansen, J. P.; D., Robertson-Andersson; M., Troell. (2006). Control of the herbivorous gastropod Fissurella mutabilis (Sow.) in a land-based integrated abalone–seaweed culture. Aquaculture, 255 : 384–388

Harzallah,A. (2003). Transport de polluants dans la lagune de Bizerte simule par un modele de circulation de l'eau. Bull. Inst. Natn. Scien. Tech. Mer de Salammbô, Vol. 30, 2003.

Jing-Wen, Liu et Shuang-lin Dong. (2001a). Comparative studies on utlizing nitrogen capacity between two macroalgae Gracilaria tenuistipitata var liui (rhodophyta) and Ulva pertusa (chlorophyta) I. Nitrogen storage under nitrogen enrichment and starvation. Journal of Environmental Sciences, 13 : 318-322.

Jing-Wen, Liu et Shuang-lin Dong. (2001b). Comparative studies on utlizing nitrogen capacity between two macroalgae Gracilaria tenuistipitata var liui (rhodophyta) and Ulva pertusa (chlorophyta) II. Feedback controls of intracellular nitrogen pools on nitrogen uptake. Journal of Environmental Sciences, 13 : 323-327.

Kaladharan, P., K. Vijayakumaran, V. S. K. Chennubhotla .(1996). Optimization of certain physical parameters for the mariculture of *Gracilaria edulis* (Gmelin) Silva in Minicoy lagoon (Laccadive Archipelago). Aquaculture, 139 : 265-270.

Ksouri, J. et R. Ben Said. (1998). Potentialités en macroalgues: Cartographie et biomasse de l'agorophyte Gracilaria dans le lac Bizerte. Bulletin INSTM, Vol. 25 : 17-34

Ksouri, J., Ben Said, R. et Pellegrini, M. (1999). Résultats des cultures experimentales de la rhodophycée Gracilaria verrucosa papenfuss dans le lac Bizerte, Tunisie septentrionale. Bull. Inst. Sci. Tech. Mer de Salammbô, vol.26 p : 113-127.

Ksouri, J., F. Mensi et R. Ben Said.(2000). Ajustement de certains paramètres de culture par bouturage de *Gracilaria verrucosa* (algue rouge), Hudson papenfuss, dans le lac de Bizerte. Bulletin INSTM, Vol. 27 : 69-74

Ksouri, J., F. Mensi et K. Sahli-Hamza. (2006). Evaluation de la capacité régénératrice de l'algue rouge *Gracilaria verrucosa (*hudson) papenfuss du lac de Bizerte (Tunisie septentrionale). Bulletin INSTM, Vol. 33 : 59-68

Lapointe, B. E. (1981). The effects of light and nitrogen on growth, pigment con tent, and biochemical composition of *grac1larl4 foliieera* v. *angvstissima* (gigartinales, rhodophyta). J. Phycol., 17 : 90-95

Mansouri, T. (1996). Application de la télédétection et des systèmes d'information géographiques à l'étude du fonctionnement hydrologique du lac de Bizerte et de son bassin versant. DEA, Fac. Sci. Tunis, 84p.

Marinho-Soriano, E.; R.A. Panucci; M.A.A. Carneiro et D.C. Pereira. (2009). Evaluation of *Gracilaria caudata* J. Agardh for bioremediation of nutrients from shrimp farming wastewater. Bioresource Technology, 100 : 6192-6198

Marinho-Soriano, E.; Fonseca, P.C.; Carneiro, M.A.A. et W.S.C. Moreira. (2006). Seasonal variation in the chemical composition of two seaweeds. Bioresource Technology, 97 : 2402-2406.

Murphy,J. et J.P. Riley.(1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Anal. Chem. Acta, 27:21-36

Ortiz, J. ; Uquiche, E. ; Robert, P. ; Romero, N. ; Q. Vilma et L. Catherine.(2009). Functional and nutritional value of the Chilean seaweeds Codium fragile, Gracilaria chilensis and Macrocystis pyrifera. Eur.J.Lipid Sci.Technol., 111: 320-327.

Preisendorfer, R.W. (1986). Secchi disk science: visual optics of natural waters. Limnol. Oceanogr. 31: 909-926.

Guo-zhong, R.; Ji-cheng, W. et M. Chen. (1984). Cultivation of *Gracilaria* by means of low rafts. Hydrobiologia, 116/ 117: 72-76.

Schwartz, D. (1983). Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. Flammarion Médecine, Paris : 318p.

Sfriso, A., Marcomini, A. et B. Pavoni. (1994). Gracilaria distribution, production and composition in the lagoon of Venice. Bioresource Technology, 50 : 165-173

Smit A.J. , A.M. Fourie, B.L. Robertson, D.R. du Preez.(2003).Control of the herbivorous isopod, Paridotea reticulata, in Gracilaria gracilis tank cultures. Aquaculture, 217 : 385–393

Solorzano, L.(1969). Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypochloride method. Limnol. Oceanogr., 14 : 799-801

Troell, M.; Halling, C.; Nillsson, A.; Buschmann, A.H.; Kautsky, N. et L. Kautsky. (1997). Integrated marine cultivation of Gracilaria chilensis (Gracilaria, Rhodophyta) and salamon cages for reduced environnemental impact and

increased economic outpout. Aquaculture, 156: -61

Troell, M.; A. Joyce; T. Chopin; A. Neori; A. H. Buschmann et Jian-Guang Fang. (2009). Ecological engineering in aquaculture — Potential for integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine offshore systems. Aquaculture, 297: 1-9

Wen, X.; Changlian, P.; Houcheng, Z.; Zhifang, L.; Guizhu, L.; Shaowei, C. et Li. Ping. (2006). Nutritional composition and assessment of *Gracilaria Lemaneiformis* Bory. Journal of Integrative Plant Biology, 48 : 1047-1053.

Westermeier, R.; Gómez, I. W. et Rivera, P. (1993). Suspended farming of *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta, Gigartinales) at Cariquilda River, Maullín, Chile. Aquaculture, 113 : 215-229

Xu, J. et G. Kunshan.(2008). Growth, pigments, UV-absorbing compounds and agar yield of the economic red seaweed Gracilaria lemaneiformis (Rhodophyta) grown at different depths in the coastal waters of the South China Sea. J. Appl. Phycol., 20:681–686

Yang, Y., X. Fei, J. Song , H. Hu , G. Wang , K. Chung.(2006). Growth of Gracilaria lemaneiformis under different cultivation conditions and its effects on nutrient removal in Chinese coastal waters. Aquaculture 254 : 248–255.