



HAL
open science

Caractérisation de la microalgue rouge *Porphyridium marinum* sous différentes conditions de culture et valorisation de ces métabolites

Nesrine Gargouch

► **To cite this version:**

Nesrine Gargouch. Caractérisation de la microalgue rouge *Porphyridium marinum* sous différentes conditions de culture et valorisation de ces métabolites. Biochimie [q-bio.BM]. Université Clermont Auvergne [2017-2020]; Université de Sfax (Tunisie), 2018. Français. NNT : 2018CLFAC095 . tel-02389370

HAL Id: tel-02389370

<https://theses.hal.science/tel-02389370>

Submitted on 2 Dec 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Clermont-Auvergne
Université de Sfax



**ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE,
SANTÉ, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT**

THESE

Présentée à

L'Université de Sfax, Tunisie

par

Nesrine GARGOUCH

En vue de l'obtention

Du Diplôme de Docteur en BIOCHIMIE

**Caractérisation de la microalgue rouge *Porphyridium marinum* sous
différentes conditions de culture et valorisation de ses métabolites**

Soutenue le 14/12/2018, devant le jury composé de :

M. Hafedh MEJDOUB, Professeur, Université de Sfax, Tunisie (Président)

M. Ahmed REBAI, Professeur, Centre de Biotechnologie de Sfax, Tunisie (Rapporteur)

Dr. Nathalie CASSE, Maître de Conférences, HDR, Laboratoire Mer Molécules et Santé (EA 2160), France (Rapporteuse)

M. Philippe MICHAUD, Professeur, Université Clermont-Auvergne, France (Examinateur)

Dr. Céline LAROCHE, Maître de Conférences, HDR, Université Clermont-Auvergne, France (Directrice de thèse)

Dr. Imen FENDRI, Maître de Conférences, HDR, Université de Sfax, Tunisie (Directrice de thèse)

Institut Pascal UMR CNRS 6602, 68178 Aubière, France

Dédicaces

Je dédie ce travail à toute ma famille mais je remercie particulièrement :

Mes chers parents à qui je dois mon bonheur et ma réussite, pour leurs sacrifices et leur amour infini. Que dieu leur procure bonne santé et longue vie et que ce modeste travail soit le fruit de vos efforts et sacrifices innombrables

Ma chère sœur Ines pour sa précieuse aide tout au long de ce projet. Je ne pourrais exprimer ma profonde reconnaissance.

Ma chère sœur Mariem pour son affection et son soutien.

Mes neveux Mehdi et Aziz et mes nièces Sarra et Linda pour la joie et le bonheur qu'ils m'ont apporté tout au long de cette thèse

Remerciements

Ce travail de thèse en cotutelle a été effectué en collaboration avec l'Institut Pascal, laboratoire CNRS UMR 6602, de l'Université Clermont-Auvergne, France et le laboratoire de Biotechnologies Végétales appliquées à l'amélioration des cultures, département Science de la Vie de la Faculté des Sciences de Sfax de l'Université de Sfax, Tunisie.

Au terme de ce travail j'adresse mes profonds remerciements aux Professeurs **Evelyne Gil** et **Claude-Gilles Dussap** pour m'avoir accueillie dans l'Axe GePEB de l'Institut Pascal de l'Université Clermont-Auvergne.

Je tiens à remercier profondément mes deux directrices de thèse **Céline LAROCHE** et **Imen FENDRI** pour la qualité de leur encadrement. Leur aide précieuse et les conseils qu'elles m'ont prodigués m'ont permis de mener à bien ce projet. Je les remercie également pour m'avoir aidée à réaliser ce travail avec rigueur et patience, pour avoir toujours su faire preuve d'une grande disponibilité et soutien et pour le temps consacré à la correction de ce manuscrit. Qu'elles trouvent ici l'expression de ma grande estime et ma profonde gratitude.

Mes vifs remerciements s'adressent également au **Pr. Slim ABDELKAFI** et le **Pr. Philippe MICHAUD**, pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser ce projet dans les meilleures conditions, de leur confiance, de leur encouragement et de leurs précieuses directives tout au long de la réalisation du projet. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Une partie de ce travail a été réalisée au Centre de Biotechnologie de Borj Cedria, Tunisie sous la direction du **Dr. Salem ELKAHOUI**. Je tiens à lui exprimer ainsi qu'à toute l'équipe toute ma reconnaissance et mes sincères remerciements pour leur accueil bienveillant au sein du laboratoire, pour leurs conseils très précieux ainsi que pour la confiance qu'ils m'ont témoignée.

J'exprime tous mes reconnaissances à l'ensemble des membres de jury : **Pr. Ahmed REBAI**, **Pr. Hafedh MEJDOUB**, **Dr. Nathalie CASSE** et **Pr. Philippe MICHAUD** d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.

Je ne saurais oublier de remercier tous les membres de l'Institut Pascal, du laboratoire de Biotechnologie Végétales appliquées à l'amélioration des cultures ainsi que l'unité de Biotechnologie des Algues pour leur accueil chaleureux, leur disponibilité et leur aide très précieuse.

Finalement je tiens à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Productions scientifiques

Gargouch N., Karkouch I., Elleuch J., Elkahoui S., Michaud P., Abdelkafi S., Laroche C., Fendri I., Enhanced B-phycoerythrin production by the red microalga *Porphyridium marinum*: A powerful agent in industrial applications, *International Journal of Biological Macromolecules*, 120 (2018), 2106–2114.

Gaignard C¹., **Gargouch N**¹., Dubessay P., Delattre C., Pierre G., Laroche C., Fendri I., Abdelkafi S., Michaud P., New Horizons in Culture and Valorization of Red Microalgae, *Biotechnology Advances*, 37 (2019), 193-222.

Gargouch N., Karkouch I., Elkahoui S., Michaud P., Laroche C., Fendri I., Optimization, purification and antioxidant activity of B-phycoerythrin from *Porphyridium marinum*, **Communication par affiche** aux Journées Internationales de Biotechnologie de l'Association Tunisienne de Biotechnologie (A.T.Biotech), 2018.

Gargouch N., Abdelkafi S., Fendri I., Développement d'une méthode d'extraction et de dosage des phospholipides microalgaux, **Communication par affiche** aux Journée Scientifique de l'Agro-Alimentaire (AMIAA), 2016

¹ Co-auteur

Sommaire

Introduction générale	1
Synthèse bibliographique	4
1.Généralités sur les algues	5
2.Origine et classification des microalgues	6
3.Les microalgues rouges	9
3.1. Taxonomie.....	9
3.2. Microalgues rouges du genre <i>Porphyridium</i>	10
3.2.1. Classification des <i>Porphyridium</i>	10
3.2.2. Spécificité morphologique et physiologique des <i>Porphyridium</i>	11
3.3. La photosynthèse chez les microalgues rouges	13
4.Cultures des microalgues	15
4.1. Paramètres affectant la croissance des microalgues.....	16
4.1.1.Lumière	16
4.1.2. Source de Carbone	18
4.1.2.1. Culture autotrophe.....	19
4.1.2.2. Culture hétérotrophe et mixotrophe	21
4.1.3. Source d'azote	25
4.1.4. Le phosphore et le soufre	26
4.1.5. Température	27
4.2. Avantage et limitations des cultures mixotrophe et hétérotrophe	27
4.3. Techniques de culture des microalgues.....	29
4.3.1. Système ouvert	29
4.3.2. Système fermé	31
5.Métabolites d'intérêts produits par les microalgues rouges	34
5.1. Protéines et pigments	34
5.2. Les polysaccharides.....	39
5.3. Les lipides	42
6.Valorisation des microalgues rouges.....	43
6.1. Valorisation de la biomasse microalgale et des pigments photosynthétiques....	43

6.2. Valorisation des exopolysaccharides	45
Matériels et Méthodes	48
1.Souche et conditions de culture	49
1.1. Milieu de culture	49
1.2. Conditions de culture de la souche <i>Porphyridium marinum</i>	50
1.3. Suivi de la cinétique de croissance	50
2.Extraction des métabolites	50
2.1. Extraction des exopolysaccharides	50
2.2. Extraction des protéines	50
2.3. Extraction des lipides	51
2.4. Extraction des pigments	51
2.4.1. Extraction des pigments liposolubles	51
2.4.2. Extraction des pigments hydrosolubles (les phycoérythrine)	51
2.5. Dosage de l'amidon	52
3.Dosages colorimétriques	52
3.1. Dosage des nitrates	52
3.2. Dosage d'acétate	53
3.3. Dosage des oses totaux	53
3.4. Dosages des oses neutres et acides	54
3.4.1. Dosages des oses neutres	54
3.4.2. Dosage des oses acides	54
3.4.3. Corrections des interférences	55
3.5. Dosage des protéines solubles selon la méthode de Lowry et al. (1951)	55
3.6. Dosage des sulfates	56
4.Caractérisation structurale et physico-chimique des métabolites	56
4.1. Analyse de la fraction lipidique	56
4.2. Composition en monosaccharides des polysaccharides	57
4.3. Analyse infrarouge (IRTF)	58
4.4. Chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de la lumière laser multi-angles (CES-DLLMA)	59

4.5. Etude rhéologique	61
5.Obtention de polysaccharides de différents poids moléculaires	61
6.Optimisation de la production de B-phycoérythrine (B-PE).....	62
6.1. Criblage des facteurs influençant la production de B-PE	62
6.2. Optimisation de la production de B-phycoérythrine à l'aide de la méthode de surface de réponse (RSM)	63
7.Purification de B-phycoérythrine	64
8.Test des activités biologiques et antioxydantes.....	64
8.1. Test des activités biologiques.....	65
8.1.1. Activité antibactérienne.....	65
8.1.1.1. Méthode de diffusion sur puits.....	65
8.1.1.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice	65
8.1.2. Activité anti- <i>Candida albicans</i>	65
8.1.3. Inhibition de la formation du biofilm <i>Candida albicans</i>	66
8.1.4. Activité anticancéreuse	66
8.2. Test des activités anti-oxydantes	67
8.2.1. Activité de piégeage du DPPH.....	67
8.2.2. Pouvoir réducteur	67
8.2.3. Pouvoir chélateur de fer	68
8.2.4. Activité inhibitrice de l'oxydation du β -carotène	68
Résultats et discussion	69
Chapitre 3:Optimisation de la production de B-phycoérythrine par la microalgue rouge <i>Porphyridium marinum</i> et test de ses activités antioxydantes	70
Introduction	71
1.Criblage des facteurs <i>via</i> le plan Placket-Burman.....	73
2.Optimisation de la production de B-phycoérythrine moyennant le plan Box-Behnken	74
2.1. Ajustement et validité du modèle.....	76
2.2. Analyse de surface de réponse sur la quantité de B-PE extraits à partir de <i>Porphyridium marinum</i>	77
3.Fractionnement et purification de B-PE.....	82
4.Evaluation de l'activité antioxydante de la B-PE.....	85

4.1. Pouvoir du piégeage du radical DPPH.....	85
4.2. Pouvoir chélateur du fer	86
4.3. Pouvoir réducteur	87
4.4. Activité inhibitrice de l'oxydation du β -carotène	88
5.Relation composition en acides aminés et activités antioxydantes	89
Conclusion.....	91
Conclusion générale et perspectives	93
Références bibliographiques	97

Liste des tableaux

Tableau 1: Classification des microalgues marines (Jeffrey et al., 2011).....	8
Tableau 2: Principales applications des exopolysaccharides provenant de microalgues rouges	47
Tableau 3: Gradient utilisé en CEAHP pour l'analyse des monosaccharides	58
Tableau 4: Domaine expérimental du plan Plackett-Burman et niveaux des variables indépendantes	62
Tableau 5: Domaine expérimental du plan Box-Behnken et niveaux des variables indépendantes	63
Tableau 6: Analyse de la variance (ANOVA) du modèle polynomial de premier degré	73
Tableau 7: Coefficients de régression du modèle mathématique ajusté du plan Plackett- Burman	74
Tableau 8: Conditions expérimentales et réponse obtenue suivant le plan Box-Behnken	75
Tableau 9: Coefficients de régression du modèle mathématique ajusté du plan Box-Behnken	76
Tableau 10: Analyse de la variance (ANOVA) du modèle polynomial de second degré.....	77
Tableau 11: Etapes de purification de la B-phycoérythrine à partir de <i>P. marinum</i>	83
Tableau 12: Séquence d'acides aminés des sous-unités α et β de B-PE analysées par l'outil ProtParam (http://www.expasy.ch/tools/protparam.html)	90

Liste des figures

Figure 1: Origine endosymbiotique des microalgues.....	7
Figure 2: Taxonomie de la microalgue rouge <i>P. marinum</i> (Algaebase)	10
Figure 3: Observation au microscope électronique à transmission (MET) de <i>P. marinum</i> montrant une division cellulaire binaire	11
Figure 4: Ultrastructure des microalgues rouges.....	12
Figure 5: Modèle structural du complexe énergétique phycobilisome.	13
Figure 6: Schéma simplifié représentant les mécanismes de la phase lumineuse et de la phase sombre de la photosynthèse chez les microalgues rouges.....	15
Figure 7: Vitesse de production d'oxygène chez les microalgues en fonction de l'irradiance	17
Figure 8: Schéma des voies métaboliques pour l'assimilation du carbone et la production d'énergie chez les microalgues photoautotrophes, hétérotrophes et mixotrophes)	24
Figure 9: Exemples de culture de microalgues dans des bassins ouverts.	30
Figure 10: Cultures dans différents photobioréacteurs de différentes entreprises.	33
Figure 11: Structure des chlorophylles.....	35
Figure 12: Structure des carotènes	35
Figure 13: Voie de biosynthèse de l'hème	36
Figure 14: Synthèse de phycocyanobiline et phycoérythrine à partir de biliverdine	37
Figure 15: Courbes d'isoréponses en 3D (à droite) et 2D (à gauche) illustrant l'effet des interactions les plus significatives sur la production de B-PE par <i>P. marinum</i> : (A) NaNO ₃ et K ₂ HPO ₄ ; (B) NaNO ₃ et intensité lumineuse; (C) K ₂ HPO ₄ et intensité lumineuse.	78
Figure 16: Comparaison entre les cinétiques de croissance et la production de B-phycoérythrine par <i>P. marinum</i> dans les conditions standard et optimisée	81
Figure 17: Profil d'élution de B-PE sur colonne DEAE-Cellulose	84
Figure 18: Analyse SDS-PAGE du B-PE purifié à partir de <i>P. marinum</i>	85
Figure 19: Activité de piégeage du radical DPPH par la protéine B-PE.....	86
Figure 20: Pouvoir chélateur du fer par la B-PE extraite de <i>P. marinum</i>	87
Figure 21: Pouvoir réducteur de la molécule B-PE.....	88
Figure 22: Capacité du B-PE à inhiber le blanchiment du β-carotène	89

Liste des abréviations

A	: Absorbance
AA	: Acide Arachidonique
ACCase	: Acyl-CoA-Carboxylase
Acétyl-CoA	: Acétyl-Coenzyme A
ACs	: Anhydrases carboniques
AGMI	: Acides Gras Mono-Insaturés
AGPI	: Acides Gras Poly-Insaturés
ALA	: Acide aminolévulinique
AMB	: Amphotéricine B
AMP	: Ampécilline
ANOVA	: Analyse de la variance
APCs	: Allophycocyanines
ATP	: Adenosine triphosphate
BHA	: Hydroxyanisole butylé
BHT	: Hydroxytoluène butyle
B-PE	: B-phycoérythrine
BPS	: Bound Polysaccharide
BV	: Biliverdine IX a
CEAHP	: Chromatographie Echangeuse d'Anions à Haute Performance
CES-DILMA	: Chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de la lumière Laser multi-angles
Chl a	: Chlorophylle a
Chl b	: Chlorophylle b
Chl c	: Chlorophylle c
CID	: Carbone Inorganique Dissous
CMI	: Concentration Minimale Inhibitrice
CPG	: Chromatographie en Phase Gazeuse
CPS	: Capsular Polysaccharide

CR	: Centre Réactionnel
CTAB	: Chlorure de cétyl pyridinium
Cyt	: Cytochrome
DHA	: Acide Docosahéxaénoïque
DMSO	: Diméthylsulfoxyde
DPPH	: 1,1-diphényle-2-picrylhydrazyle
EDTA	: Ethylène Diamine Tetra-acétate
EMAG	: Ester Méthylique d'Acide Gras
EMP	: Embden-Meyerhof-Parnas
EPA	: Acide Eicosapentaénoïque
EPS	: Exopolysaccharide
ET	: Transfert d'Electron
FRET	: Transfert d'Energie par Résonance de Fluorescence
G3P	: 3-phosphoglycéraldéhyde
Gc	: Point de compensation
GOGAT	: Glutamate Synthase
GS	: Glutamine Synthétase
Gs	: Point de saturation
H2Y	: Ferredoxine oxydoréductase
HHP	: Homogénéisateur à Haute Pression
HPAEC-PAD	: Chromatographie Echangeuse d'Anion couplée à un Détecteur Ampérométrie Pulsée
HPLC	: Chromatographie en phase liquide à haute performance
IMD	: Imidazole
IP	: Indice de Pureté
IRTF	: Analyse Infrarouge à Transformée de Fourier
LB	: Luria Broth
Malonyl-CoA	: Malonyl-Coenzyme A
MCC	: Mécanisme de concentration du CO ₂
m-HBP	: méta-Hydroxybiphényle

NADP	: Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADPH	: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NiR	: Nitrite Réductase
NR	: Nitrate Réductase
PBR	: Photobioréacteur
PBS	: Phosphate buffered saline
PCs	: Phycocyanines
Pcy A	: Phycocyanobiline synthase
Peb A	: Ferredoxine oxydoréductase
Peb B	: Ferredoxine oxydoréductase
PECs	: Phycoerythrocyanines
PEG	: Poly-Ethylène-Glycol
PEs	: Phycoerythrines
PES	: Polyéthersulfure
PG	: Gallate de Propyle
P-G	: Pénicilline G
PP	: Pentose-Phosphate
PS	: Polysaccharide
PSI	: Photosystème I
PSII	: Photosystème II
PVC	: Polychlorure de Vinyle
R-PE	: R-phycoérythrine
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute medium
RSM	: Méthodologie de surface de réponse
RuBisCo	: Ribulose-1,5-Biphosphate Carboxylase/Oxygénase
RuBP	: Ribulose-Biphosphate
SAB	: Albumine de Sérum Bovin
SDS-PAGE	: Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SM	: Solution Métallique

SV	: Solution vitaminique
TBHQ	: Tert-Butylhydroquinone
TCA	: Cycle de l'acide citrique
TFA	: Acide Trifluoroacétique
THA	: Transfert d'Atome d'Hydrogène
UFC	: Unité Formant une Colonie
VLDL	: Lipoprotéine de très basse densité (Very Low Density Lipoprotein)
WB	: Winge Broth

Nomenclature des acides aminés

Acides aminés	Codes à trois lettres	Codes à une lettre
Alanine	Ala	A
Arginie	Arg	R
Acide aspartique	Asp	D
Acides glutamique	Glu	E
Asparagine	Asn	N
Cystèines	Cys	C
Glutamine	Glu	Q
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

Introduction générale

Les microalgues constituent un groupe diversifié d'organismes unicellulaires photoautotrophes eucaryotes présents dans de nombreux écosystèmes, particulièrement dans les environnements aquatiques. Elles peuvent aussi bien coloniser les milieux à basse qu'à haute température, sous forte ou faible intensité lumineuse, à des pH très variés, des milieux hautement salins ou encore les eaux profondes. Cette grande diversité des espèces de microalgues ouvre les portes sur de nombreuses possibilités d'utilisation.

Elles suscitent depuis quelques années un intérêt particulier du fait de leur production de lipides pouvant servir à la production de biocarburants. Par ailleurs, certaines souches de microalgues produisent également d'importantes quantités d'acides gras mono et polyinsaturés (AGMI et AGPI) à longues chaînes (plus de 18 carbones) estérifiés. Il s'agit, entre autres, d'acides gras essentiels de type *omega-3* tels que les acides eicosapentaénoïque (EPA) et docosahexaénoïque (DHA), mais également de type *omega-6* tel que l'acide arachidonique (AA). Les microalgues sont également des productrices de polysaccharides intra- et extracellulaires pouvant trouver des applications comme hydrocolloïdes (gélifiants, épaississants et stabilisants) ou actifs biologiques (substituts des glycosaminoglycanes, éliciteurs, antioxydants, etc...) leur ouvrant des débouchés dans les domaines de la pharmaceutique ou de la cosmétique (de Jesus Raposo et al., 2015). Cependant malgré cette large diversité, seulement une dizaine d'espèces de microalgues ont été cultivées à l'échelle industrielle dont les espèces principales sont *Arthrospira* (Spiruline), *Chlorella* et *Dunaliella*. Ces dernières années, les microalgues rouges ont eu l'attention de plusieurs chercheurs et industriels en raison de leur richesse en polysaccharides sulfatés, pouvant être exploités comme hydrocolloïdes dans diverses applications ou dans le domaine cosmétique en tant qu'agents bioactifs (Arad et Levy-Ontman, 2010; Delattre et al., 2016), et des pigments photosynthétiques essentiellement les phycobiliprotéines utilisées en tant que sonde fluorescente en cytométrie de flux et en microscopie. Parmi les microalgues rouges exploitées à l'échelle industrielle on cite les microalgues du genre *Porphyridium* et *Rhodella*. Elles présentent un intérêt croissant ces dernières années en raison de leur richesse en composés tels que les polysaccharides extracellulaires, les phycobiliprotéines et les AGPI à longue chaîne (Pignolet et al., 2013).

La microalgue choisie au cours de ce projet de thèse en tant que microorganisme modèle est *Porphyridium marinum*. En condition photoautotrophe, la microalgue est connue à la fois pour sa production d'exopolysaccharide (EPS) et pour la présence de phycoerythrine. Toutefois, l'accumulation de ces métabolites a été bien décrite pour les conditions autotrophes

contrairement aux conditions hétérotrophes et mixotrophes qui font encore défaut. Les rares études disponibles en mixotrophie et hétérotrophie sur le genre *Porphyridium* datent des années 1999 où les chercheurs Fabregas et al. ont montré une augmentation de la synthèse des phycoérythrine et des polysaccharides en mixotrophie (Fabregas et al., 1999a). Une nouvelle étude réalisée en 2009 sur la microalgue *Porphyridium cruentum* a montré une accumulation des lipides de l'ordre de 11% en condition hétérotrophe (Oh et al., 2009).

Dans ce contexte, l'objectif initial de ce projet de thèse était d'étudier l'impact d'une source de carbone organique sur le métabolisme global de la microalgue rouge *Porphyridium marinum*. Dans la suite du travail, les exopolysaccharides produits dans les deux conditions de culture ont été testés pour leurs activités biologiques à savoir antibactérienne, antibiofilm et anticancéreuse. Un dernier volet a été exploré au cours de ce travail de thèse portant sur l'optimisation de la production du pigment majoritaire B-phycoérythrine par *P. marinum* et test de ses activités antioxydantes. La recherche d'une éventuelle activité biologique à partir de ces métabolites identifie la microalgue rouge *P. marinum* comme une source potentielle pouvant être exploitée dans divers domaines afin de lutter contre l'émergence de nombreuses maladies liées au mode de vie, au stress oxydatif et à l'augmentation de la résistance des agents pathogènes aux antibiotiques et antifongiques conventionnels.

Ce manuscrit est organisé en quatre parties. La première partie consistera en une synthèse bibliographique présentant l'état de l'art concernant les algues et plus précisément les microalgues, leur classification, les principaux produits issus de ces microorganismes, ainsi que leurs éventuelles applications. Après une seconde partie consacrée aux démarches expérimentales, la troisième partie présentera et discutera les résultats obtenus sous la forme de 3 chapitres. La quatrième partie de ce rapport clôturera ce projet par une conclusion et ouvrira des perspectives.

Synthèse bibliographique

PLAN

1. Généralités sur les algues
 2. Origine et classification des microalgues
 3. Les microalgues rouges
 4. Culture des microalgues
 5. Métabolites d'intérêt produits par les microalgues rouges
 6. Valorisation des microalgues rouges
-

1. Généralités sur les algues

Les algues sont des organismes photosynthétiques responsables de plus de 50% du renouvellement de l'oxygène (www.ifremer.fr). Elles représentent un ensemble d'organismes qui se trouvent préférentiellement dans les milieux aquatiques (Prescott, 2003). Elles sont également capables de coloniser divers habitats terrestres tels que le sol et les roches, les arbres, ou encore les édifices architecturaux (Sialve et Steyer, 2013). Ce sont des végétaux possédant un appareil végétatif simple appelé thalle et se caractérisent par l'absence de racines, de tiges et de feuilles. L'air, la lumière, les sels dissous et l'eau sont des éléments écologiques essentiels à leur développement.

Les algues regroupent à la fois des organismes pluricellulaires nommés macroalgues et des organismes unicellulaires, dont la taille varie du micron à la centaine de microns, qualifiés de microalgues ou phytoplanctons (Cadoret et Bernard, 2008 ; Sialve et Steyer, 2013). Elles peuvent se reproduire de façon sexuée grâce à la production des gamètes mais aussi par reproduction asexuée généralement par scission binaire. Ce type de reproduction asexuée est généralement observé chez les algues unicellulaires parmi lesquelles on cite la microalgue verte du genre *Chlamydomonas* qui est un exemple typique où les deux modes de reproductions sexuée et asexuée sont observés (Wollman et Girard-Bascou, 1994).

Grace à la présence de chlorophylle, pigment présent chez toutes les algues même s'il est parfois caché par d'autres surnuméraires, l'énergie lumineuse est captée par les algues et transformée en énergie chimique par la synthèse de composés carbonés (à savoir les glucides). Ce sont des organismes autotrophes. Toutefois, il existe des espèces d'algues capables de passer d'une croissance autotrophe à une croissance hétérotrophe en absence de lumière et en utilisant une source de carbone organique (en général le glucose). Cette caractéristique est notamment connue chez les microalgues comme par exemple celles du genre *Chlamydomonas* (Boyle et al., 2017), *Chlorella* (Nzayisenga et al., 2018), ou *Porphyridium* (Oh et al., 2009). Toutefois, l'hétérotrophie a été également observée chez certaines macroalgues rouges comme *Chondrus*, *Porphyra* et *Gracilaria* qui se sont montrées capables d'assimiler directement des composés organiques (Pérez, 1997).

Les algues forment un groupe polyphylétique d'organismes puisqu'elles n'ont pas toutes un ancêtre commun direct et sont apparues à des périodes différentes. Selon le code international de nomenclature pour les algues, les champignons et les plantes, les micro et macroalgues sont réunies au sein de la même famille (McNeill et al., 2011). En effet, en tenant compte de la nature de leurs pigments et de leurs réserves cellulaires, les algues sont divisées en cinq

grands phylums : les Chlorophytes, les Euglénophytes, les Chrysophytes, les Rhodophytes et les Pyrrophytes. Les Cyanophytes sont parfois également classifiées dans les microalgues de par leur capacité à réaliser la photosynthèse, mais ce sont des organismes procaryotes appartenant au règne des bactéries.

2. Origine et classification des microalgues

Les microalgues sont des organismes unicellulaires dont la grande majorité des espèces possède un ou plusieurs flagelles. Les cellules sont délimitées par une membrane plasmique le plus souvent associée à une paroi polysaccharidique. Elles contiennent dans leur cytoplasme de nombreux organites nécessaires à leur fonctionnement et à leur métabolisme à savoir les chloroplastes, les amyloplastes, les oléoplastes, une mitochondrie ayant la plupart du temps des crêtes aplaties, un noyau nettement délimité par une membrane et un pyrénôïde disposé au centre du chloroplaste (Wei et al., 2013). Il s'agit d'un groupe d'organismes polyphylétiques qui présentent une diversité taxonomique importante. En effet, leur évolution a été basée sur la théorie de l'endosymbiose qui s'appuie sur l'étude des mitochondries et des plastes. Comme illustré sur la **Figure 1**, une première association symbiotique entre un procaryote photosynthétique (cyanobactérie) et un eucaryote non photosynthétique serait à l'origine de l'apparition des Plantae avec des plastes primaires (formés avec seulement deux enveloppes membranaires) comprenant les chlorophytes (lignée verte), les glaucophytes et les rhodophytes (lignée rouge). Par conséquent, les membranes photosynthétiques des plastes des algues rouges évoquent fortement les thylacoïdes des bactéries photosynthétiques. De plus, l'équipement pigmentaire des rhodophytes (chlorophylle a et phycobiliprotéines) ressemble à celui des cyanobactéries. D'autres endosymbioses sont apparues au cours de l'évolution des microalgues donnant naissance à des organismes avec des plastes secondaires et même tertiaires. Cependant, des incertitudes se sont posées sur l'ordre des apparitions et l'indépendance des événements. La plus étudiée aujourd'hui est l'endosymbiose secondaire qui a eu lieu entre une algue rouge et une cellule hôte non photosynthétique et donnant naissance à l'ancêtre de tous les Chromalvéolates à l'origine des cryptophytes, des haptophytes, des straménopiles, des ochrophytes (hétérokontophytes) et des dinoflagellés. Par un procédé similaire, les euglénophytes, les chlorarachniophytes et les dinoflagellés verts ont acquis leurs plastides à partir des chlorophytes ancestraux (Jeffrey et al., 2011).

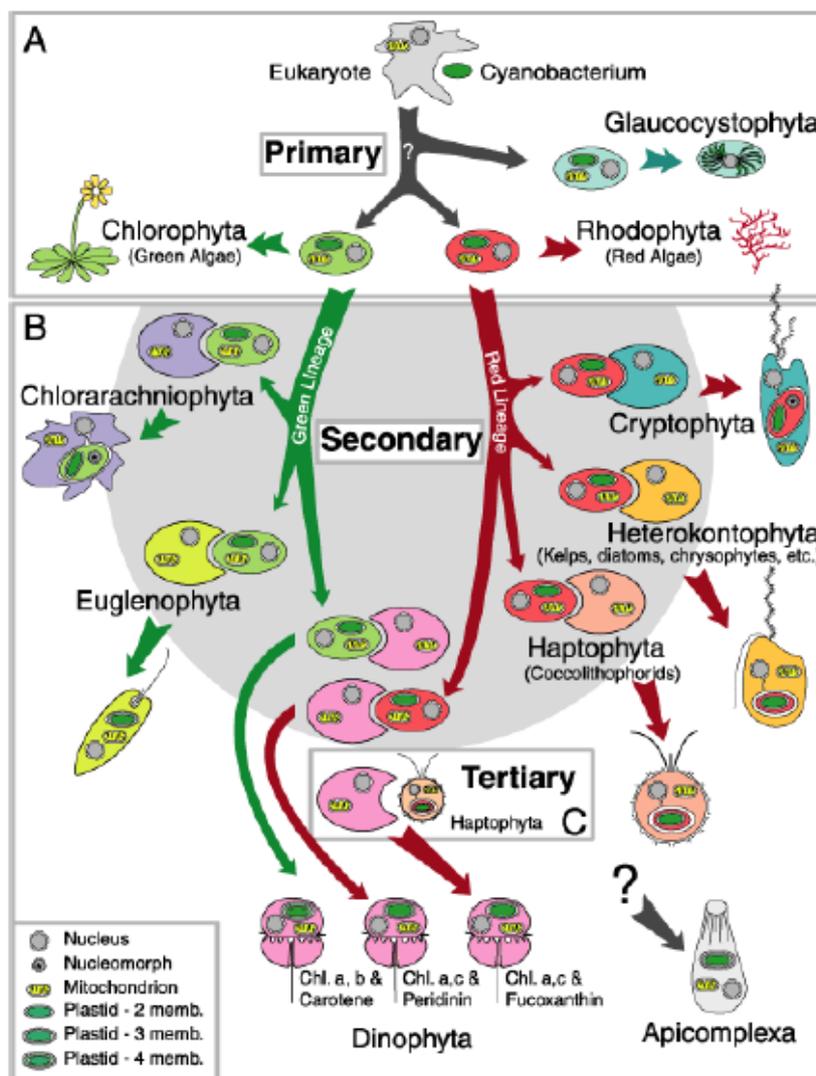


Figure 1: Origine endosymbiotique des microalgues (Jeffrey et al., 2011)

L'endosymbiose a donc eu un rôle important dans l'évolution des organismes vivants en créant des organismes chimériques à l'origine de nouvelles lignées. Elle a permis le transfert des gènes conduisant à la création de nouveaux génomes. Ainsi, Guiry (2012) ont estimé à 72500 le nombre d'espèces d'algues dont 44000 ont été décrites. Ces organismes avec des physiologies variées sont répartis dans les différents groupes taxonomiques des eucaryotes (**Tableau 1**). Elles ont un rôle important en tant que producteur de composés naturels utilisés dans plusieurs applications technologiques et thérapeutiques. Elles transforment des substances inorganiques en molécules organiques telles que lipides, protéines et glucides (Sadovskaya et al., 2014). De plus, leur principale application demeure liée à la nutrition aquacole du fait de leur position à la base de la chaîne alimentaire aquatique.

Tableau 1: Classification des microalgues marines (Jeffrey et al., 2011)

Division	Classe	Nom commun
<u>Procarvotés</u>		
Cyanophyta	Cyanophyceae (comprend des espèces précédemment connues sous le nom de Prochlorophyceae)	Cyanophyte, Cyanobacteria, Algues bleues, Prochlorophytes
<u>Eucaryotes</u>		
Glaucocystophyta	Glaucocystophyceae	Glaucocystophyte
Rhodophyta	Rhodophyceae	Algue rouge
Heterokontophyta	Bacillariophyceae	Diatomée
	Bolidophyceae	Bolidophyte
	Chrysophyceae	Algues brunes-dorées
	Dictyochophyceae	Silicoflagellée
	Eustigmatophyceae	Eustigmatophyte
	Pelagophyceae	Pelagophyte
	Phaeothamniophyceae	Phaeothamniophyte
	Pinguiphyceae	Pinguiphite
	Raphidophyceae	Raphidophyte
	Synurophyceae	Synurophyte
	Xanthophyceae	Xanthophyte
Haptophyta	Pavlovophyceae Prymnesiophyceae (Coccolithophyceae)	Algues brunes-dorées
Cryptophyta	Cryptophyceae	Cryptomonad
Dinophyta	Dinophyceae	Dinoflagellée
Euglenophyta	Euglenophyceae	Euglenophyte
Chlorarachniophyta	Chlorarachniophyceae	Chlorarachniophyte
Chlorophyta	Chlorophyceae	Chlorophyte (algues vertes) Prasinophyte
	Prasinophyceae	
Streptophyta	Mesostigmatophyceae	Mesostigmatophyte

3. Les microalgues rouges

3.1. Taxonomie

Les algues rouges sont un groupe monophylétique de la division des Rhodophyta résultant d'une endosymbiose primaire. La division des Rhodophytes regroupe les microalgues et les macroalgues dont la majorité vit en milieu aquatique. Elle est constituée de 700 genres et plus de 10000 espèces (Kraft et Woelkerling, 1990; Silva et Moe, 1997). En se basant sur la morphologie, les Rhodophytes ont été divisées en deux sous-classes les Florideophyceae qui sont majoritairement des algues pluricellulaires et macroscopiques et les Bangiophyceae qui représentent les algues rouges unicellulaires. Ces dernières sont majoritairement représentées par l'ordre des Porphyridiales (Dixon, 1973).

D'après la classification de Yoon et al. en 2006, les microalgues rouges sont présentes dans les deux sous-divisions : Cyanidiophytina et Rhodophytina. En effet, les Cyanidiophytina représentent un groupe de microalgues rouges unicellulaires vivant dans des conditions extrêmes telles que les milieux acides et ceux à haute température. Les Cyanidioschyzon et Cyanidium (famille des Cyanidiacées) sont les genres les plus connus dans l'ordre des Cyanidiales. La famille des Galdieriaceae composée de cinq espèces appartenant au genre *Galdiera* a été identifiée comme une deuxième famille de la sous division des Cyanidiophyta. Chez les Rhodophytina, six classes ont été établies, dont trois comprennent des microalgues : les Porhyridiophyceae, les Rhodellophyceae et les Stylonematophyceae. La famille des Porphyridiaceae (classe des Porhyridiophyceae, ordre des Prophyridiales) enregistre cinq genres unicellulaires à savoir *Erythrobolus*, *Flintiella*, *Porphyridium*, *Rhodoplax* et *Timspurckia*. Les Rhodellophyceae sont divisés en deux ordres, les Dixonellales et les Glaucosphaerales appartenant respectivement, selon Yoon et al. (2006), aux familles Dixonelliaceae et Glaucosphaeraceae. Les Dixonelliaceae comprennent deux espèces, *Dixonella grisea* et *Bulboplastis apyrenoidosa*, tandis que les Glaucosphaeraceae contiennent quatre genres unicellulaires *Glaucosphaera*, *Rhodella*, *Neorhodella* et *Corynoplastis* (Scott et al., 2008). Les microalgues rouges sont également présentes dans la classe des Stylonematophyceae divisée en deux ordres à savoir Rufusiales et Stylonematales qui sont eux même composés de dix-huit genres dont la majorité est filamenteuses.

Les microalgues rouges restent finalement un groupe de microorganismes très diversifié mais très peu exploité. En effet, parmi ces microorganismes le genre *Porphyridium* reste le

plus couramment étudié pour les applications biotechnologiques, notamment *P. purpureum* et *P. cruentum* (Sato et al., 2017 ; Kim et al., 2017).

3.2. Microalgues rouges du genre *Porphyridium*

3.2.1. Classification des *Porphyridium*

Les microalgues du genre *Porphyridium* sont des rhodophycées (lignée rouge) appartenant à l'ordre des Porphyridiales et à la famille des Porphyridiaceae. La majorité a été isolée à partir d'une variété d'habitats à savoir les eaux douces, saumâtres et marines ainsi que les couches superficielles humides des sols (Jeffrey et al., 2011). Dans la base des données algaebase (www.algaebase.org), le genre *Porphyridium* contient 9 espèces à savoir *aerugineum*, *cruentum*, *griseum*, *marinum*, *purpureum*, *schinzii*, *sordidum*, *violaceum* et *wittrockii*. Parmi les différentes espèces du genre *Porphyridium* décrites à ce jour, la microalgue rouge *Porphyridium marinum* (utilisée comme modèle d'étude dans la présente thèse) a été décrite pour la première fois en 1937 par Kylin (Kylin, 1937). La taxonomie la plus récente associée à cette microalgue est décrite dans la banque de données Algaebase (**Figure 2**).

Division : RHODOPHYTA

Sous-division : RHODELLOPHYTINA

Classe : PORPHYRIDIOPHYCEAE

Ordre : PORPHYRIDIALES

Famille : PORPHYRIDIACEAE

Genre : *Porphyridium*

Espèce : *marinum*

Figure 2: Taxonomie de la microalgue rouge *P. marinum* (Algaebase)

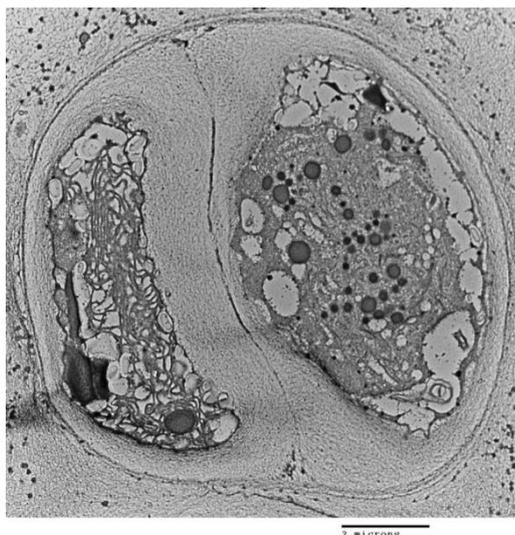


Figure 3: Observation au microscope électronique à transmission (MET) de *P. marinum* montrant une division cellulaire binaire

3.2.2. Spécificité morphologique et physiologique des *Porphyridium*

Les microalgues rouges sont des organismes marins benthiques, ne possèdent pas de flagelles et dont la taille varie entre 1 et 40 μm selon l'espèce et le stade de croissance. La plupart d'entre eux sont des organismes unicellulaires sphériques ou ovoïdes. Leurs cellules d'une couleur rouge variable, selon l'âge et les conditions de culture, sont enrobées dans une gaine mucilagineuse de nature polysaccharidique. Contrairement aux végétaux, les microalgues rouges n'ont pas de véritable paroi cellulaire mais elles sont intégrées dans une couche de mucilage dont l'épaisseur varie beaucoup selon les conditions de culture (Brody et Emerson, 1959; Yang et al., 2010). Ce mucilage polysaccharidique est partiellement soluble dans le milieu extérieur augmentant ainsi sa viscosité. Le mucilage des microalgues rouges marines est une structure très complexe en polysaccharides associés à des fractions protéiques (Arad et Levy-Ontman 2010 ; Capek et al., 2008). Son rôle physiologique reste incertain même s'il protège vraisemblablement des fluctuations de l'environnement et/ou des prédateurs. La structure de ces exopolymères n'a pas encore été élucidée à l'exception de quelques séquences oligosaccharidiques (Geresh et al., 2009; Gloaguen et al., 2004). En effet, les exopolysaccharides de *P. marinum* d'un poids moléculaire supérieur à 1800 kDa sont principalement constitués de xylose suivis par le galactose et du glucose. En outre, ces EPS présentent des teneurs importantes en acide glucuronique et en groupements sulfate (Soanen et al., 2016).

Parmi les espèces du genre *Porphyridium*, *P. cruentum* est l'espèce la plus étudiée morphologiquement dans la littérature. En effet, les cellules sont sphériques à ovales dont la taille varie de 5 à 10 μm en phase exponentielle et de 7 à 16 μm en phase stationnaire (www.algaebase.org). Le nucléole est situé dans la région du noyau adjacente au chloroplaste. Ce dernier possède une double membrane et il est en forme d'étoile avec des lobes sur la périphérie de la cellule. Le pyrénoloïde est situé au centre de la cellule à l'intérieur du chloroplaste. Les granules d'amidon (également appelé amidon floridéen) sont souvent présents dans le cytoplasme et entre les différents composants cellulaires. Les mitochondries ont des crêtes aplaties et sont principalement localisées près des dictyosomes (pile de sacs appartenant à l'appareil de Golgi) à la périphérie de la cellule (**Figure 4**) (Gantt et Conti, 1965 ; Scott et al., 2011).

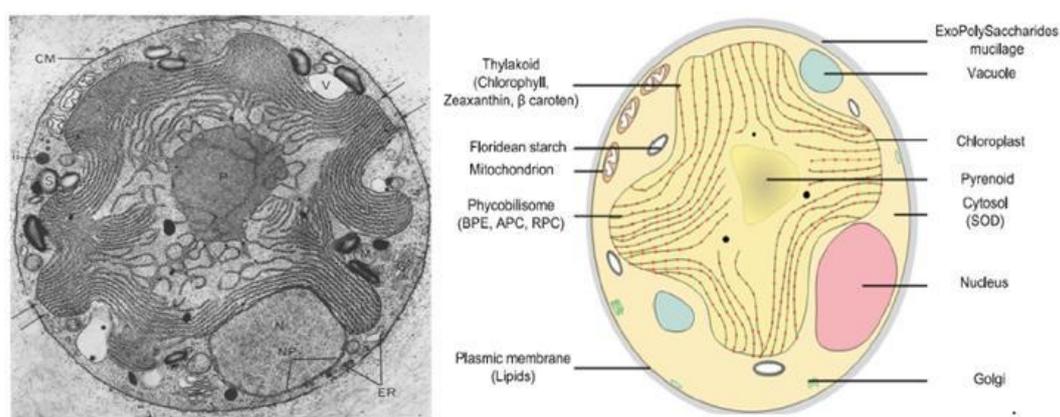


Figure 4: Ultrastructure des microalgues rouges (de gauche à droite : Image au microscopique électronique de *P. cruentum*, schéma de l'ultrastructure des microalgues rouges,) (Pignolet et al., 2013 ; Scott et al., 2011)

En plus de la chlorophylle et des caroténoïdes, les Rhodophytes se distinguent des autres microalgues par la présence de phycobiliprotéines (nommées aussi phycobilines). Ces derniers montrent une évolution par rapport aux Cyanobactéries et aux Glaucophytes par la présence d'un groupe de pigments supplémentaires : les gamma phycobiliprotéines (Larkum, 2016). Ces chromoprotéines sont constituées de deux sous-unités α et β et parfois trois sous-unités (α , β , et γ) et sont notamment présentes chez le genre *Porphyridium*. Elles sont constituées de groupes linéaires de tétrapyrrole appelés bilines liés de manière covalente à des résidus de cystéine et formant un complexe appelé phycobilisome (**Figure 5**) (Bermejo et al., 2003a). Les phycobiliprotéines sont répartis en quatre classes en fonction de leur absorption de lumière : Phycoerythrine (PEs; $\lambda_{\text{max}} = 540\text{--}570_{\text{nm}}$), Phycocyanine (PCs; $\lambda_{\text{max}} = 610\text{--}$

620_{nm}), Allophycocyanines (APCs; $\lambda_{\max} = 650\text{--}655_{\text{nm}}$) et Phycoerythrocyanines (PECs; $\lambda_{\max} = 560\text{--}600_{\text{nm}}$) (Glazer, 1985). Les phycoérythrine ont été classées en trois classes principales en fonction de leur origine et de leur spectre d'absorption, la B-phycoérythrine (B-PE) (pics à 545, 565_{nm}), la R-phycoérythrine (R-PE) (pic à 565_{nm}) et la C-phycoérythrine (pic à 565_{nm}) (Manirafasha et al., 2016). En effet, les préfixes R et B ont été attribués en fonction des taxons de l'organisme dont ils étaient isolés. R-PE a été isolé de Rhodophyta et B-PE de l'ordre Bangiales (algue rouge) des Rhodophyta. À ces longueurs d'onde, la chlorophylle a (Chl a) et les caroténoïdes sont très peu abondants (Larkum, 2016). Grâce à leur équipement photosynthétique, les microalgues rouges peuvent vivre jusqu'à 250 m de profondeur.

3.3. La photosynthèse chez les microalgues rouges

Les phycobilisomes représentent le premier maillon de la photosynthèse chez les microalgues rouges en raison de leur localisation à la surface externe des thylacoïdes. Ils sont composés d'un centre tri-cylindrique (allophycocyanine) à partir duquel sont développés six bras constitués de phycoérythrine et de phycocyanine (**Figure 5**).

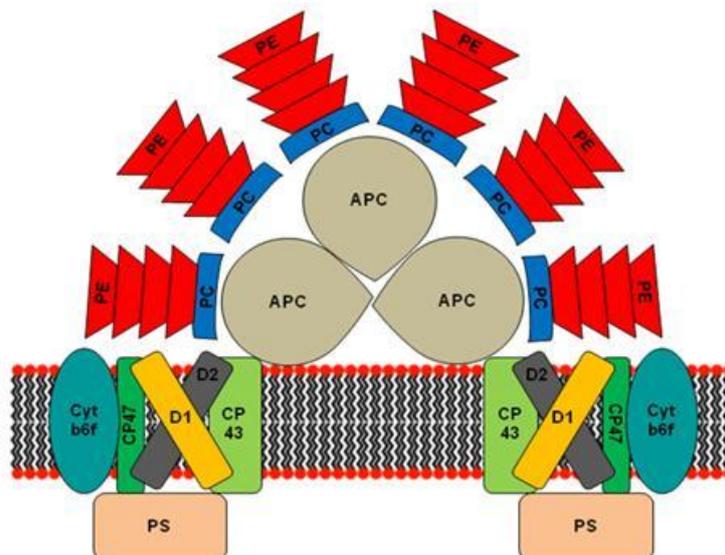


Figure 5: Modèle structural du complexe énergétique phycobilisome PE: phycoérythrine; PC: phycocyanine; APC: allophycocyanine; D1 et D2: protéines liées à la chlorophylle; cyt: cytochrome (Wiethaus et al., 2010).

En effet, l'énergie lumineuse est absorbée dans un premier temps par les phycoérythrine pour être par la suite transférée vers les phycocyanines. Les phycocyanines à leur tour

transfèrent leur énergie vers l'allophycocyanine qui représente l'accepteur final de l'énergie. Cette dernière est finalement transférée vers le centre réactionnel (CR) situé dans la membrane des thylacoïdes (Zhao et al., 2011). Ce phénomène de transfert d'énergie représente la première phase de la photosynthèse dite phase lumineuse. Ainsi au cours de cette phase, lorsqu'un photon est absorbé par un pigment, un transfert d'électrons et de protons vers un accepteur d'électron « NADP⁺ » est déclenché. En effet, la dissociation d'une molécule d'eau accompagnée par un apport de protons (utilisé pour la synthèse d'ATP), et la libération d'une molécule d'oxygène auront lieu au niveau du photosystème II (PSII) (**Figure 6**). Par la suite, une molécule de NADPH est produite dans le photosystème I (PSI) suite à un transfert d'électrons assuré par les transporteurs d'électrons et le cytochrome b6f (**Figure 6**). Ce transfert d'électrons est accompagné par une production de molécules d'ATP (Masojídek et al., 2013). Ces produits de conversion (ATP et NADPH) seront utilisés au cours de la phase sombre, dite aussi non photochimique, pour la synthèse de la matière organique principalement les glucides. Cette phase se déroule en quatre étapes dont trois sont cycliques et rentrent dans le cycle de Calvin. La première étape consiste à la fixation du CO₂ sur la première molécule du cycle de Calvin ribulose-biphosphate (RuBP). Cette réaction de carboxylation nécessitera l'utilisation d'une enzyme appelée la RuBisCo. Cette enzyme permet la formation de trois molécules instables à six carbones qui donnent rapidement six molécules de 3-phosphoglycérate à 3 carbones. La deuxième étape correspond à la réduction du 3-phosphoglycérate. Ce dernier est tout d'abord phosphorylé par l'ATP pour donner l'acide biphospho-glycérique, qui sera lui-même réduit par le NADPH pour former le 3-phosphoglyceraldéhyde (G3P). Une partie de ce dernier sera dirigée vers la synthèse des glucides (quatrième étape) tandis que l'autre partie va servir à la régénération du RuBP qui sera réutilisé pour fixer le CO₂ (troisième étape) (**Figure 6**) (Masojídek et al., 2013).

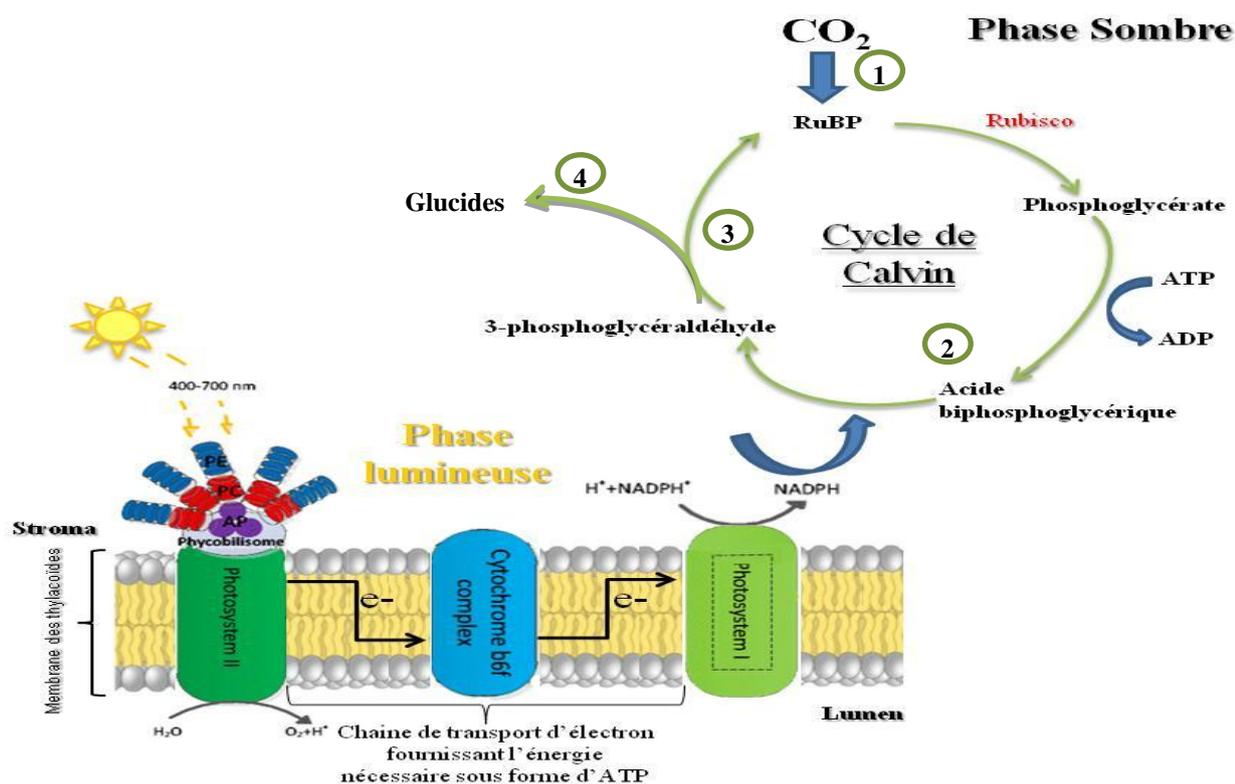


Figure 6 : Schéma simplifié représentant les mécanismes de la phase lumineuse et de la phase sombre de la photosynthèse chez les microalgues rouges.

(1) fixation du CO_2 sur le ribulose-biphosphate (RuBP) pour la formation du phosphoglycérate à trois carbones, (2) phosphorylation du phosphoglycérate en acide biphosphoglycérique qui sera réduit à son tour par la NADPH en 3-phosphoglycéraldéhyde, (3) régénération du RuBP, (4) synthèse des glucides.

4. Cultures des microalgues

Les microalgues sont capables de se développer dans une large gamme de conditions grâce à leur système d'adaptation. De ce fait, on les retrouve aussi bien à basses qu'à hautes températures, sous forte ou faible intensité lumineuse, à des pH très variés, dans des milieux hautement salins ou encore dans les eaux profondes jusqu'à 250 m. Ces différentes conditions de croissance vont faire varier la composition des cellules ainsi que les quantités et les caractéristiques des différentes substances qu'elles produisent (Juneja et al., 2013 ; Lee et al., 2015).

4.1. Paramètres affectant la croissance des microalgues

Les paramètres affectant la croissance des microalgues peuvent être divisés en deux catégories principales liées à la composition du milieu de culture et aux conditions opératoires (lumière, température, pH).

4.1.1. Lumière

L'énergie lumineuse est un facteur important qui catalyse la photosynthèse chez les microalgues. Elle affecte significativement leur cinétique de croissance, mais cela reste vrai jusqu'à un certain seuil. En effet, de nombreux chercheurs travaillant sur les algues rouges planctoniques ont montré que le taux de croissance augmenterait significativement avec l'augmentation de l'intensité lumineuse (Gaignard et al., 2018; Soanen et al., 2016; Villay et al., 2013). Cependant, au-delà d'une valeur seuil, appelée point de saturation (G_s), une photoinhibition peut être observée : les cellules restent viables mais le taux de croissance diminue (Evans et Maureen, 1974; Ritz et al., 2000; Vonshak et Torzillo, 2004). Cette valeur seuil est spécifique à chaque espèce de microalgue. Par conséquent, une production de microalgues peut se décrire au travers de l'irradiance optimale utilisée. En effet, on distingue le point de compensation (G_c) qui correspond au flux lumineux spécifique pour lequel la production de dioxygène par photosynthèse compense exactement la consommation de dioxygène par la respiration, une phase de limitation où la quantité de lumière n'est pas assez importante pour permettre une photosynthèse optimale ($G < G_s$) ; une phase de saturation où la photosynthèse est maximale (G_s) et une phase d'inhibition où la lumière est trop forte et entraîne un stress ($G > G_s$) (**Figure 7**). Une telle courbe peut être obtenue expérimentalement en mesurant la production de dioxygène en fonction du flux lumineux incident. Pour *Porphyridium marinum*, *Rhodella violacea* et *Flintiella sanguinaria*, les valeurs de G_s ont été respectivement déterminées à 360, 420 et 280 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$, confirmant ainsi les différences entre les espèces (Gaignard et al., 2018; Soanen et al. 2016; Villay et al., 2013).

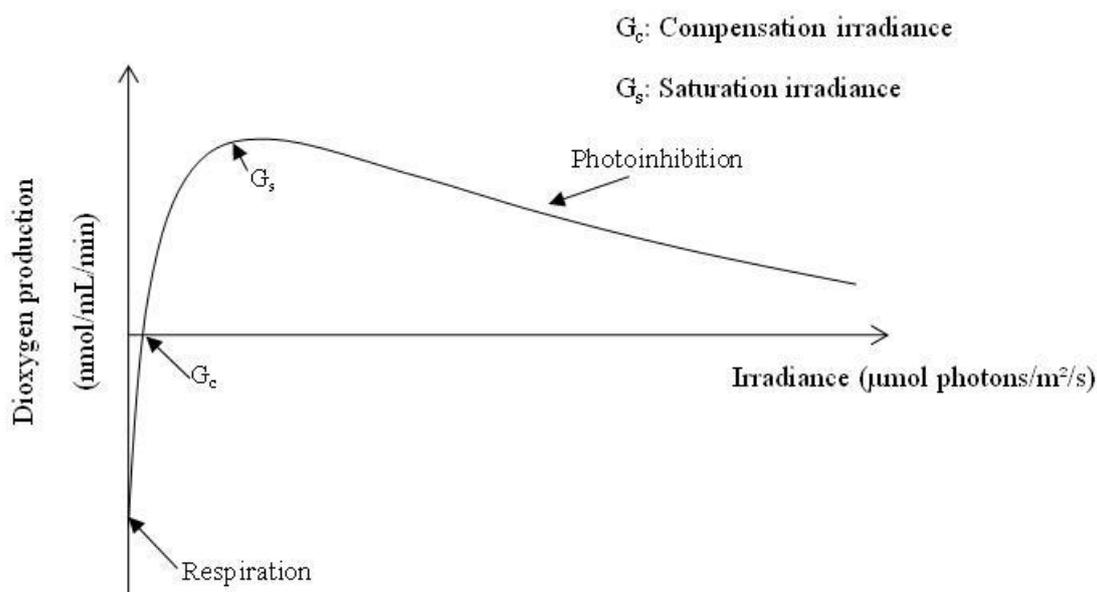


Figure 7: Vitesse de production d'oxygène chez les microalgues en fonction de l'irradiance (Gaignard et al., 2019)

Certaines microalgues peuvent tolérer des intensités lumineuses élevées. Par exemple, *Chlorella sorokiniana* peut se développer sous des irradiances de 2500 μmol photons/m²/s avec une augmentation de la production des chlorophylles (chl a et chl b) et de certaines caroténoïdes (zéaxanthine et violaxanthine) (De-Bashan et al., 2008). Contrairement à ce genre de microalgues, les microalgues rouges, dont l'habitat est généralement plus profond que les chlorophycées, tolèrent moins bien les fortes irradiances. En effet, Fuentes et al. (1999) ont observé une inhibition de l'activité photosynthétique chez *P. cruentum* à partir de 2000 μmol photons/m²/s.

Le cycle d'éclairage a également un impact sur l'activité photosynthétique et donc sur le métabolisme des microalgues. En effet, les microalgues rouges se multiplient généralement sous une photopériode de 24/0 h, 16/8 h et 12/12 h (jour/nuit, heures) et sous des intensités lumineuses comprises entre 27 et 500 μmol photons/m²/s. Par conséquent, une relation existe entre la durée d'éclairage et l'intensité lumineuse appliquée. Certaines études évoquent que ces microalgues doivent être exposées à un taux de photons minimal par jour pour avoir une croissance optimale pendant une longue photopériode. A titre d'exemple, l'étude menée par Oh et al. (2009) sur une culture de *P. cruentum* à faible irradiance (10 à 25 μmol photons/m²/s) a montré que des concentrations de biomasse élevées étaient obtenues avec des photopériodes de 12/12h et 18/6h contrairement à des photopériodes de 8/16h et 0/24h. Pour généraliser, si le flux lumineux appliqué est inférieur au G_s, l'augmentation de la

photopériode aura un effet positif, tandis que si le flux lumineux est plus élevé, la diminution de la durée d'éclairage diminuera l'impact de la photoinhibition.

La qualité de la lumière est un autre paramètre influençant la croissance et la production des pigments chez les microalgues rouges. Dans ce contexte, la lumière rouge (600-700 nm) et la lumière bleue (400-500 nm) ont été utilisées par You et Barnett (2004) dans le but d'augmenter la croissance cellulaire de *P. cruentum*. Aucune différence significative dans les taux de croissance ni dans la production d'EPS n'a été observée. Cependant, pour des flux lumineux incidents identiques, des taux de croissance plus importants ont été observés par rapport à la lumière blanche. En effet, les microalgues n'utilisent pas les photons lumineux sur toute l'étendue du spectre de la lumière blanche, alors que les photons bleus et rouges peuvent directement être absorbés par les chlorophylles au niveau des antennes photosynthétiques. Il n'y a alors pas de photons « perdus ». Les teneurs en pigments photosynthétiques varient également avec l'irradiance et la qualité de la lumière, notamment pour les microalgues possédant un phycobilisome (cyanobactéries et microalgues rouges). Pour ces microalgues, une diminution significative de la phycoerythrine a été observée en présence de lumière rouge (600-700 nm) et pour des irradiances élevées (Akimoto et al., 2012 ; Marquardt et Rehm, 1995; Rahaoui, 1999), tandis que les teneurs en phycocyanine et allophycocyanines augmentent. Ce phénomène suggère une adaptation du système photosynthétique aux conditions environnementales de la culture. Selon Mihova et al. (1996), la quantité de phycobiliprotéines chez *R. reticulata* était équivalente sous lumière blanche et verte à trois intensités lumineuses chacune. Cependant, lorsque *R. reticulata* a été cultivée sous une lumière rouge et à une faible intensité lumineuse de 18 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$, la teneur totale en pigments surnuméraires a augmenté de 11,35 à 14,5% (en masse). Pour cette microalgue, la production de biomasse était maximale pour une lumière rouge et une intensité lumineuse élevée de 215 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$.

4.1.2. Source de Carbone

Toutes les microalgues décrites à ce jour sont des microorganismes photosynthétiques, capables de convertir l'énergie solaire en énergie chimique en utilisant le carbone inorganique (CO_2) comme source de carbone. Certaines espèces sont également capables d'utiliser du carbone organique divisant leur métabolisme en deux voies principales : (i) hétérotrophe, qui correspond à l'assimilation du carbone organique en l'absence de lumière et (ii) mixotrophe où

les microalgues se sont montrées capables d'assimiler le carbone organique en présence de lumière.

4.1.2.1. Culture autotrophe

Au cours de cette voie métabolique, les microalgues utilisent la lumière solaire et le dioxyde de carbone (CO_2) pour former de l'énergie et du carbone cellulaire nécessaires à leur multiplication. Le carbone inorganique utilisé par les microalgues en mode autotrophique est fourni généralement par l'atmosphère. Il peut être aussi ajouté dans le milieu de culture sous la forme de HCO_3^- ou par barbotage de gaz. La diffusion directe du CO_2 dans les milieux de culture permet d'augmenter le rendement en biomasse et de contrôler le pH. L'ajout de bicarbonate et/ou de carbonate permet de fournir une source de carbone dans le milieu dont les proportions de chaque forme dépendent du pH. En effet, à pH inférieur à 6,4, le CO_2 prédomine, à un pH compris entre 6,4 et 10,3 HCO_3^- est la forme principale alors qu'au-dessus de 10,3 le carbone est sous la forme de CO_3^{2-} . De ce fait, le pH est un facteur important pour la croissance des algues puisqu'il peut affecter la distribution des espèces de carbone inorganique (Yang et Gao, 2003) ainsi que l'activité de différentes enzymes telles que les anhydrases carboniques (ACs) catalysant l'hydratation réversible du CO_2 (Ying et al., 2014 ; Moroney et al., 2007). Ces anhydrases carboniques (ACs) ont été mis en évidence chez tous les microorganismes unicellulaires provenant à la fois d'eau douce et d'environnement marin, y compris les chlorophycées (Amoroso et al., 1998; Fisher et al., 1996) Bacillariophyceae (Iglesias-Rodriguez et Merrett, 1997; Rotatore et al., 1995), Rhodophyceae (Aizawa et al., 1986), et Haptophyceae (Nimer et al., 1996). Il existe des anhydrases carboniques extracellulaires dont le rôle est de convertir le HCO_3^- en CO_2 facilitant ainsi sa diffusion à travers la membrane cellulaire (Moroney et al., 2007). Au niveau intracellulaire, l'AC peut se situer dans le cytoplasme, les mitochondries et principalement dans le chloroplaste. Dans le cytoplasme, la métalloenzyme (AC) convertit le CO_2 en HCO_3^- afin d'empêcher sa fuite de la cellule. Dans le chloroplaste, le HCO_3^- est converti en CO_2 par une autre AC, concentrant ainsi le dioxyde de carbone autour de la RuBisCo (Rigobello-Masini et al., 2003). Cette dernière est la principale enzyme de carboxylation permettant la fixation du carbone photosynthétique. Chez les microalgues, l'approvisionnement en substrat pour la RuBisCo, le CO_2 , peut être limité par la faible solubilité de ce dernier dans l'eau et par la présence d'autres formes de carbone inorganique dissous (CID) non disponibles pour la RuBisCo, telles que le bicarbonate (HCO_3^-). Ces limites sont aggravées par les propriétés biochimiques de l'enzyme montrant une faible affinité pour le CO_2 par rapport à l'oxygène (O_2) conduisant ainsi à la

photorespiration. En effet, à des concentrations atmosphériques de CO_2 , RuBisCO ne fonctionne qu'à environ un quart de sa capacité catalytique (Moroney et al., 2007). L'existence de cette concurrence entraîne une perte d'au moins 30% de carbone fixé par la RuBisCO (Raines, 2011). Pour cette raison, et afin d'assurer un bon déroulement de la photosynthèse et donc une bonne absorption du carbone inorganique, tous les organismes photosynthétiques, des cyanobactéries aux plantes supérieures, ont développé un mécanisme de concentration du CO_2 (MCC) autour du site actif de la RuBisCO augmentant ainsi le taux de carboxylation et supprimant par conséquent la photorespiration. En effet, le HCO_3^- diffuse par transport actif à l'intérieur de la cellule. Une fois localisé dans le milieu intracellulaire, le HCO_3^- est déshydraté entraînant une concentration de CO_2 au niveau cellulaire. Le CO_2 accumulé entrera dans la phase sombre de la photosynthèse pour la synthèse de matières organiques comme démontré précédemment (paragraphe 3.3.). Dans l'algue verte modèle, *Chlamydomonas reinhardtii*, le MCC comprend des transporteurs de CID actifs qui accumulent du bicarbonate dans la cellule et des anhydrases carboniques catalysant la conversion de HCO_3^- en CO_2 (Gee et Niyogi, 2017).

Plusieurs études ont montré qu'une augmentation de la concentration externe en CO_2 contribue à une augmentation significative des taux de croissance des microalgues. Cependant, à partir d'une concentration critique, la teneur en CO_2 peut avoir une influence négative sur la croissance de ces espèces planctoniques (Chinnasamy et al., 2009; Vidyashankar et al., 2013). Néanmoins, ce seuil semble être variable. Comme décrit par Ono et Cuello (2003), *Scenedesmus sp* est l'une des microalgues les plus tolérantes au CO_2 et pourrait se développer à des teneurs de CO_2 égale à 80% dans le mélange gazeux injecté. Le taux optimal de CO_2 pour ce phytoplancton était de 10 à 20%. En outre, Hussain et al. (2017) ont montré que certaines microalgues peuvent tolérer jusqu'à 20% de CO_2 dans le gaz d'injection. Un paramètre qui peut expliquer de telles différences et qui n'est généralement pas pris en compte dans ces études est que seule une partie de ce CO_2 pourrait être disponible pour les cellules alors qu'une grande partie est éliminée. Cela dépend fortement du système de culture (PBR, étang ouvert...) et de l'efficacité du mélange, facteurs qui conditionnent la solubilisation du CO_2 en phase liquide.

La valeur critique de la concentration en CO_2 dépend alors de plusieurs facteurs : apport en CO_2 , affinité pour les cellules, taux de croissance, taille des cellules et présence des anhydrases carboniques. Par conséquent, il est nécessaire d'étudier pour chaque microalgue les conditions de croissance optimales.

4.1.2.2. Culture hétérotrophe et mixotrophe

Contrairement au métabolisme autotrophe, l'hétérotrophie est un mode au cours duquel l'acquisition de l'énergie et du carbone se fait à partir des composés organiques disponibles dans le milieu. La mixotrophie est un autre mode de culture où les microalgues sont capables de croître à la fois en autotrophie et en hétérotrophie. En effet, le carbone inorganique est fixé par photosynthèse en présence de la lumière, alors que le carbone organique est assimilé et métabolisé pour générer de l'énergie et des métabolites par respiration aérobie (Lowrey et al., 2015) (**Figure 8**). Dans la littérature il n'existe pas de conditions de culture spécifiques à ces deux modes de cultures. Généralement, il s'agit du mode autotrophe complété par une forme de carbone organique qui est le plus adopté (Chen et Zhang 1997 ; Lowrey et al., 2015).

Certaines microalgues ont la capacité de métaboliser différentes sources de carbones organiques à savoir : pyruvate, acétate, lactate, glycérol, des sucres à 6 carbones (exemples glucose et fructose), des monosaccharides à 5 carbones (exemples xyloses et arabinoses) et/ou des disaccharides (lactose, sucrose et cellobiose) (Perez-Garcia et al., 2011). Le glucose reste cependant la source de carbone la plus utilisée pour les cultures hétérotrophes et mixotrophes de microalgues. Des taux de croissance et de respiration beaucoup plus élevés sont obtenus avec le glucose qu'avec tout autre substrat organique. Cela est dû par le fait que le glucose possède plus de contenu énergétique par mole que les autres substrats (Perez-Garcia et Bashan, 2015). Par exemple, le glucose produit environ 2,8 kJ/mol d'énergie contre ~0,8 kJ/mol pour l'acétate (Boyle et Morgan, 2009).

Le glucose ainsi que d'autres molécules apparentées sont généralement métabolisés dans le cytoplasme des cellules microalgales via les voies oxydatives du pentose-phosphate (PP) et Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) (Neilson et Lewin, 1974). La PP est considérée comme la voie principale étant donné que la plupart des isozymes présentes dans cette voie participent également au cycle de Calvin (Neilson et Lewin, 1974 ; Yang et al., 2000, Hong and Lee, 2007). Cela permet de conclure que le métabolisme du carbone organique et les voies de fixation du CO₂ photosynthétique sont régulés par des contrôles cellulaires communs.

Concernant l'acétate, il est oxydé métaboliquement, selon la microalgue, dans le cycle du glyoxylate, assuré par deux enzymes (la malate synthase et l'isocitrate lyase) et le cycle TCA fournissant des squelettes carbonés, de l'énergie sous forme d'ATP et des molécules réductrices (NADH) dans les mitochondries (Perez-Garcia et al., 2011). Syrett et Wang (1963) ont mis en évidence le cycle glyoxylate chez la microalgue *Chlorella vulgaris*. En

effet, lorsqu'elle passe d'une culture autotrophe à une culture hétérotrophe riche en acétate, les activités de la malate synthase et de l'isocitrate lyase augmentent.

Le glycérol est un autre sucre utilisé par certaines microalgues. Il est converti en glycéraldéhyde 3-phosphate pour former (via la voie EMP) du pyruvate qui entrera par la suite dans le cycle TCA.

La plupart des études concernant les cultures hétérotrophes et mixotrophes ont été menées sur des microalgues vertes notamment le genre *Chlorella* (Liang et al., 2009; Xu et al., 2006 ; Ye et al., 2018). En ce qui concerne les Rhodophyceae, la capacité de se multiplier sur des sources de carbones organiques a été largement étudiée sur la famille des Cyanidiaceae. Il s'agit d'une famille unicellulaire de microalgues rouges thermophiles et acidophiles, comportant trois genres de microalgues : *Cyanidium*, *Cyanidioschyzon* et *Galdieria*. Ces algues se développent à des pH compris entre 0,05 et 5 et à des températures qui ne dépassent pas les 56 °C (Barbier et al., 2005 ; Dandamudi et al., 2017 ; Sakurai et al., 2016). Elles sont également très sensibles à la dessiccation, ce qui explique pourquoi les cellules croissent endolithiquement et sont donc sujettes à des fortes limitations de lumière ce qui entrave la croissance autotrophe. En effet, *Galdieria sulphuraria* est capable de métaboliser au moins 27 sucres ou polyols différents : disaccharides, hexoses, pentoses, désoxysugars, hexitols, pentiols, tétriols et tiols, acides aminés et certains acides organiques (Gross et Schnarrenberger, 1995; Oesterhelt et al., 1999; Schilling et Oesterhelt, 2007). En raison de cette diversité moléculaire, la microalgue a développé une machinerie enzymatique et un système d'absorption unique. Une étude génomique comparative entre une microalgue autotrophe obligatoire *Cyanidioschyzon merolae* et la microalgue *G. sulphuraria* a permis l'identification des transporteurs et de nombreux symporteurs putatifs de sucres (Barbier et al., 2005). En effet, 28 gènes distincts de transport de sucre, quatre symporteurs de galactose, quatre pour le fructose et un pour l'arabinose et le saccharose ont été identifiés chez *G. sulphuraria*. Cependant, cette caractéristique semble être assez unique. Le génome de *Cyanidioschyzon* en revanche, n'a montré qu'un seul transporteur putatif pour l'arabinose.

Une grande variété de sucres-kinases est nécessaire pour l'assimilation des substrats organiques. En effet, une analyse génomique de *G. sulphuraria* a révélé des gluco-, galacto-, fructo-, glycéro-, xylulo- et ribokinases, dont la similarité est plus importante avec les enzymes procaryotes qu'avec celles des végétaux. De plus, *G. sulphuraria* possède de nombreuses polyol déshydrogénases pour introduire des sucres-alcools dans son métabolisme hétérotrophe (Barbier et al., 2005; Stein et al., 1997). Globalement, *G. sulphuraria* et *C. merolae* présentent des mécanismes enzymatiques similaires pour les métabolismes des

glucides et du carbone organique. L'incapacité de *Cyanidioschyzon* à utiliser des glucides et des polyols peut donc être attribuée à une déficience du système de transport transmembranaire approprié plutôt qu'à un manque d'enzymes essentielles. Néanmoins, cette fonctionnalité a été récemment discutée. En effet, Moriyama et al. (2015) ont montré que *C. merolae* est capable de croître mixotrophiquement en utilisant du glycérol alors qu'aucun système de transport de ce sucre n'a été identifié au niveau génomique.

En ce qui concerne les autres Rhodophycées, la capacité à croître de manière mixo- ou hétérotrophe est moins détaillée. Il a été démontré que *P. purpureum* peut atteindre une densité cellulaire élevée dans l'obscurité complète en présence de glucose (Oh et al., 2009) grâce à la présence des transporteurs spécifiques à cet ose. De plus, Bhattacharya et al., 2013 ont démontré la présence des transporteurs de saccharose dans le génome de *P. purpureum* qui lui permettraient ainsi de consommer (en plus du glucose) des disaccharides, tels que le saccharose. Cependant, ceci n'a jamais été démontré dans la littérature. En outre, il a été prouvé que *P. cruentum* était capable de se développer en utilisant des sources de carbone telles que le glucose et l'acétate (Vazhappilly et Chen, 1998). La possibilité pour *P. cruentum* de se développer par voie mixotrophe sur une fraction bouillie de farine de *Solanum tuberosum* a également été étudiée (Fabregas et al., 1999a). En effet, la densité cellulaire de *P. cruentum* a augmenté de $4,06 \times 10^6$ cellules/mL dans les conditions autotrophes à $5,01 \times 10^6$ cellules/mL dans les conditions mixotrophes. La capacité de *Rhodella* à croître de manière hétérotrophe sur l'acétate et le glucose a également été testée, mais aucune croissance n'a été observée (Turner, 1970).

En plus d'atteindre des densités cellulaires élevées, les cultures mixotrophes et hétérotrophes entraînent généralement une forte réduction de la teneur en pigments. Cependant, certaines souches de *Galdieria sulphuraria* conservent leur appareil photosynthétique lorsqu'elles sont cultivées dans l'obscurité (Gross et Schnarrenberger, 1995; Marquardt, 1998). Dans les cultures en discontinu, on peut obtenir des concentrations de PC de 300 à 400 mg/mL, correspondant à une teneur en PC cellulaire de 5 à 10 mg/g (Schmidt et al., 2005). Cette teneur est assez faible comparée à celle d'autres microorganismes photosynthétiques tels que les cyanobactéries et notamment *Arthrospira platensis*. Cette dernière peut contenir jusqu'à 120-140 mg/g de PC lorsqu'elle cultivée en mixotrophie (Chen et al., 1996; Chen et Zhang 1997; Marquez et al., 1993). De plus, les intensités lumineuses comprises entre 0 et $100 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ n'ont aucune influence sur l'accumulation de PC dans les cultures mixotrophes cultivées sur glucose ou fructose, tandis que la lumière stimule la synthèse de PC sur des cultures en présence de glycérol. Dans ces conditions, la teneur en PC a été portée à

20 mg/g de matière sèche sous une intensité lumineuse de 80 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ (Sloth et al., 2006). Des résultats similaires ont été obtenus pour *P. cruentum* cultivée en mixotrophie sur une fraction bouillie de farine de *Solanum tuberosum*. Les concentrations de PE et d'EPS en mixotrophie sont de 10 $\mu\text{g/mL}$ et 330 $\mu\text{g/mL}$ au lieu de 7 $\mu\text{g/mL}$ et 129 $\mu\text{g/mL}$ respectivement, en condition autotrophique (Fabregas et al., 1999a). De plus, les modes de culture mixotrophe et hétérotrophe peuvent induire une accumulation de biomolécules de stockage intéressantes. Par exemple, Sakurai et al. (2016) ont montré que la quantité de glycogène chez *Galderia sulphuraria* était significativement plus élevée en présence de glucose, aussi bien dans des conditions mixotrophes qu'hétérotrophes, tandis que la teneur en lipides notamment les acides gras polyinsaturés n'augmente que dans des conditions hétérotrophiques.

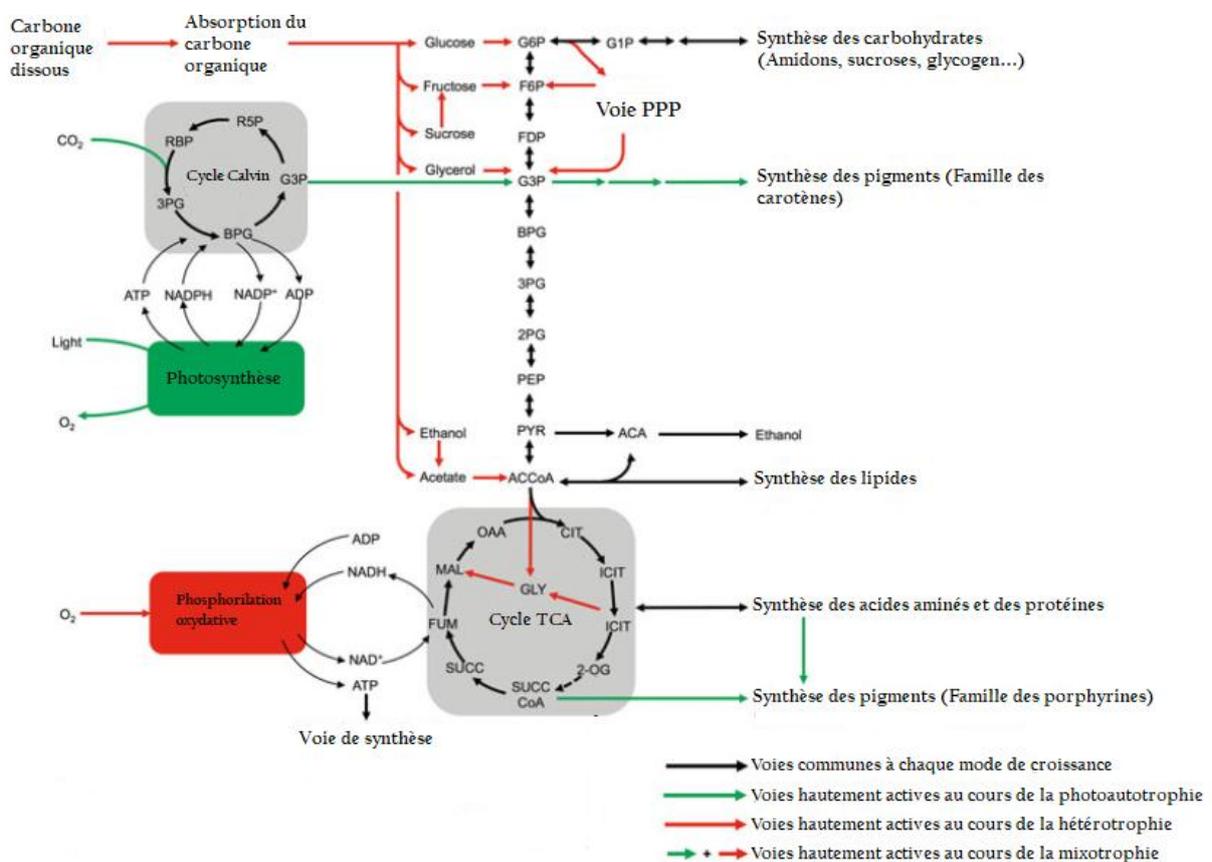


Figure 8: Schéma des voies métaboliques pour l'assimilation du carbone et la production d'énergie chez les microalgues photoautotrophes, hétérotrophes et mixotrophes (Perez-Garcia et Bashan, 2015)

4.1.3. Source d'azote

En plus du carbone, les microalgues ont besoin d'une source d'azote pour leur croissance ainsi que pour la production des pigments photosynthétiques, des acides aminés, des acides nucléiques et des coenzymes (Hu, 2005; Raven et Giordano, 2016). Les sources d'azotes les plus utilisés par les microalgues sont principalement minérales (NH_4^+ , NO_3^- et NO_2^-) mais il existe également des sources organiques telles que l'urée ou les acides aminés. En effet, des études ont montré que les cellules de *Porphyridium* sont capables d'utiliser l'urée tout en nécessitant un temps d'adaptation important (Naval et al., 1977). Cependant, le mécanisme d'absorption et d'assimilation n'a pas encore été démontré pour les microalgues rouges. De plus, Rigano (1971) a démontré que *Cyanidium caldarium* était capable d'utiliser directement le glutamate comme source d'azote.

Le nitrate est la forme d'azote dissoute la plus courante dans l'eau de mer, mais de nombreuses microalgues préfèrent utiliser l'ammonium comme nutriment (Lourenço et al., 2002; Miller et Castenholtz, 2001). En effet, l'assimilation de l'azote chez les microalgues rouges est principalement réalisée par le cycle de la glutamine synthétase (GS) – glutamate synthase (GOGAT). Lors de l'utilisation de nitrate, les microalgues doivent le réduire en ammonium avant la réaction GS. En effet, dans les cellules des algues, des anions nitrate sont importés par des transporteurs spécifiques (Galvan et Fernández, 2001) et réduits dans le cytosol en nitrite par la nitrate réductase (NR) dépendante du NADPH. Le nitrite est ensuite réduit dans les plastes en ammonium grâce à la nitrite réductase (NiR) dépendante de la ferrédoxine. Même si la voie métabolique semble être la même pour toutes les microalgues rouges, certaines différences existent. A titre d'exemple, la NR de *Porphyridium aerugineum* diffère de celle de *Cyanidium caldarium* : la première fonctionne uniquement avec le nicotinamide dinucléotide (NADH) alors que la deuxième est capable d'utiliser à la fois le NADH et le nicotinamide dinucléotide phosphate (NADPH) (Rigano, 1971). De plus, l'enzyme de *P. aerugineum* est plus sensible à la température que l'enzyme de *Cyanidium* (Rigano et Violante, 1972).

L'assimilation de l'azote est fortement liée au métabolisme du carbone. En effet, en présence d'azote, le flux du carbone issu de la fixation du CO_2 , est dirigé vers la glycolyse pour permettre la production des précurseurs d'acides aminés (Morot-Gaudry, 1997). Par conséquent, lorsque le milieu de culture des microalgues est déficient en azote, la croissance des microalgues diminue. Les cellules microalgales entrent en phase stationnaire et

accumulent des lipides (triacylglycérol) et/ou des glucides (Da Silva et al., 2009; Ho et al., 2013; Li et al., 2011) conduisant à une augmentation du volume cellulaire (Da Silva et al., 2009; Lamers et al., 2012). Pour les microalgues rouges, une carence en azote pourrait également induire une synthèse des EPS, comme montré chez *Rhodella violacea* (Villay et al., 2013), *Porphyridium marinum* (Soanen et al., 2016) ou *Flintiella sanguinaria* (Gagnard et al., 2018).

Chaloub et al. (2015) ont démontré que l'accumulation des phycobiliprotéines était stimulée par une augmentation de 25% de la concentration en nitrates dans le milieu de culture de *Rhodomonas sp.* Ainsi, une carence en azote entraînerait une diminution de la synthèse des pigments photosynthétiques, tels que la chlorophylle et les phycobiliprotéines. Cependant, cet effet n'est pas immédiat puisque la microalgue adapte son métabolisme en stockant l'azote dans les phycobiliprotéines. En effet, pendant les premiers jours, la teneur en pigments reste constante, mais une fois que la microalgue *Rhodomonas sp.* s'adapte à la carence en azote, la teneur en chlorophylle diminue d'environ 50% et de 90% pour la phycoérythrine. Ce phénomène conduit à un verdissement des cultures de microalgues rouges (Da Silva et al., 2009). Néanmoins, la privation d'azote entraîne une décoloration sans perte de viabilité cellulaire, et la restauration de la source d'azote favorise la re-pigmentation des algues (Levy et Gantt, 1990).

4.1.4. Le phosphore et le soufre

Bien qu'il ne représente que 1% de la biomasse totale, le phosphore est également un nutriment majeur pour la croissance des microalgues. Il participe à plusieurs processus cellulaires tels que le transfert d'énergie (ATP) et la synthèse d'acides nucléiques et de phospholipides.

L'orthophosphate (PO_4^{2-}) est généralement la forme la plus préférée pour les algues et son absorption est contrôlée par des transporteurs situés au niveau de la membrane cellulaire. Des études génomiques ont démontré que les algues eucaryotes ont généralement plusieurs transporteurs de phosphate (Gobler et al., 2011; Read et al., 2013). Néanmoins, ils ont rarement été caractérisés fonctionnellement (Li et al., 2012, 2006). Tout comme l'azote, une carence en phosphore entraîne une diminution de la croissance cellulaire.

Le soufre est également important pour le développement des cellules microalgales. Il entre dans la composition de certains acides aminés, tels que la cystéine et la méthionine, mais aussi dans la formation du coenzyme A, impliqué dans le métabolisme énergétique. Il est

utilisé par les organismes photosynthétiques principalement sous forme de sulfate (SO_4^{2-}). Pour les espèces de Rhodophyta tels que *Porphyridium* ou *Rhodella*, l'effet de l'épuisement du sulfate sur la synthèse des exopolysaccharides a été étudiée (Arad et al., 1992, 1988). En effet, les quantités de polymère libérées étaient similaires à celles dues à une carence en azote, mais le taux de sulfatation a été réduit de moitié en cas de privation en sulfate (Arad et al., 1988). Ces auteurs ont suggéré que pour les deux carences nutritionnelles, la synthèse des protéines était réduite, affectant ainsi la croissance cellulaire et favorisant par conséquent l'accumulation des EPS.

4.1.5. Température

En plus des nutriments et de la lumière, la croissance des microalgues dépend également de la température. En effet, il existe des microalgues mésophiles qui se développent à des températures comprises entre 20 et 25 °C, d'autres thermophiles qui se multiplient à des températures supérieures à 40 °C et enfin psychrophiles dont les températures de croissance sont inférieures à 17 °C.

Chaque espèce de microalgue est alors caractérisée par une température de croissance optimale. Les microalgues rouges telles que les espèces *Porphyridium* ou *Rhodella* sont des microalgues mésophiles dont les taux de croissance sont maximaux à une température d'environ 20 °C. Au-delà de cette valeur, le taux de croissance diminue (Ras et al., 2013). Cette valeur seuil est fortement dépendante de la souche. En effet, d'après les mesures de l'activité photosynthétique, la température optimale de *Rhodella violacea* (Villay et al., 2013) et de *Flintiella sanguinaria* (Gaignard et al., 2018) était de 24 °C contre 28 °C pour *Porphyridium marinum* (Soanen et al., 2016). En revanche, pour les Cyanidiaceae (espèces *Galderia*, *Cyanidium* et *Cyanidioschyzon*), les températures de croissance optimales sont beaucoup plus élevées et les cellules sont généralement cultivées à une température supérieures à 40 °C (Gardian et al., 2007; Sakurai et al., 2016; Yamaoka et al., 2011).

4.2. Avantage et limitations des cultures mixotrophe et hétérotrophe

En comparaison avec les cultures photoautotrophiques, les cultures mixotrophes et hétérotrophes offrent plusieurs avantages qui sont les suivant (Perez-Garcia and Bashan, 2015) :

(i) L'élimination de la lumière dans les cultures hétérotrophes réduit les coûts de fonctionnement des bioréacteurs et permet un meilleur contrôle de la croissance des microalgues,

(ii) Augmentation remarquable de la densité cellulaire et de la productivité des microalgues contribuant à la réduction des coûts de récolte,

(iii) Amélioration de la production des pigments photosynthétique à savoir le β -carotène, la zéaxanthine et l'astaxanthine surtout en condition mixotrophique,

(iv) Augmentation de la production des métabolites tel que les lipides. En 2014, Leyva et al. ont montré que la culture de *Chlorella vulgaris* cultivée dans des conditions hétérotrophes a permis une croissance plus rapide et une accumulation de lipides plus importante que dans des conditions autotrophes.

Bien que les caractéristiques métaboliques et physiologiques de la culture hétérotrophe et mixotrophe offrent la possibilité d'augmenter considérablement la densité cellulaire et la productivité des microalgues, la production commerciale utilisant ces régimes de culture n'est pas rentable à l'heure actuelle (Kröger et Müller-Langer, 2011; Liang, 2013; Taberero et al., 2012; Wang et al., 2014). Cela est dû à plusieurs limitations majeures : (i) augmentation des dépenses énergétiques en utilisant des sources de carbone organique telle que le glucose. Par exemple, les lipides de microalgues hétérotrophes peuvent remplacer en partie les huiles fossiles dans la production de biodiesel, mais d'un point de vue économique, ce concept est limité par le coût des éléments nutritifs. Quatre-vingt pourcent des coûts de production de biodiesel à partir de *Chlorella protothecoides* proviennent du glucose contenu dans le milieu de culture (Li et al., 2007), (ii) contamination par d'autres microorganismes, à savoir les bactéries, qui se développent plus rapidement que les microalgues. Par conséquent, la gestion de la culture monoalgale axénique est une étape cruciale. Pour ce faire, les cultures de microalgues en condition hétérotrophe ou mixotrophe nécessitent un environnement stérile. (iii) Dans certains cas, l'absence de lumière nuit à la synthèse des pigments photosynthétiques, la covalorisation des pigments n'étant donc pas possible (Perez-Garcia et Bashan, 2015).

Pour surmonter le problème des coûts et conduire des cultures économiques de microalgues, il faut trouver une source de carbone de valeur faible tel que les eaux usées, les matières lignocellulosiques et les déchets de procédés industriels pour soutenir la croissance des microalgues hétérotrophes et/ou mixotrophes. Il faut concevoir des bioréacteurs économiques adaptés à la production industrielle hétérotrophe et/ou mixotrophe en utilisant des matériaux moins chers et mettre en œuvre des stratégies de mélange alternatives utilisant une source d'énergie renouvelable ainsi que des stratégies de stérilisation à bon marché. Finalement, réduire les coûts de traitement en aval, en particulier ceux de la récolte et de la transformation de la biomasse, en augmentant par exemple la production des exopolysaccharides pour

favoriser la floculation de la biomasse microalgale (Kröger et Müller-Langer, 2011; Liang 2013; Tabernero et al. 2012).

4.3. Techniques de culture des microalgues

L'intérêt pour les microalgues a augmenté depuis de nombreuses années en raison de leur richesse en composés à haute valeur ajoutée. Dans le but d'améliorer leur exploitation industrielle, différents types de technologies ont été développées pour la culture à grande échelle. Ces systèmes étaient basés sur : (i) la captation de la lumière (artificielle ou lumière du soleil); (ii) l'agitation de la culture (mécanique et/ou par bullage); (iii) l'application d'une source de carbone (carbone organique et ou inorganique) et (iv) la récolte de la biomasse. Ces méthodes de culture ont considérablement évolué au cours des quarante dernières années. Au début, les microalgues étaient cultivées dans des bassins ouverts où une partie importante de la culture est exposée à l'atmosphère. Ensuite, des modes de culture en continu et contrôlés dans des systèmes fermés tels que les photobioréacteurs (PBR) ont été développés pour la production des microalgues.

4.3.1. Système ouvert

Les systèmes ouverts sont les plus exploités pour la culture industrielle des microalgues en raison de leur facilité d'utilisation et leur faible coût. Ces systèmes utilisent généralement la lumière naturelle. Ils varient par leur forme, le type de matériaux utilisés, ainsi que le système de mélange. Les premiers étangs ouverts, qualifiés de bassins naturels (**Figure 9a**), étaient sans agitation. Ces bassins ont généralement une faible productivité cellulaire. Pour améliorer les taux de croissance, des systèmes de mélange ont ensuite été mis en place. La forme initiale testée était circulaire (**Figure 9b et 9c**) et était utilisée pour la production de biomasse pour l'alimentation animale (aquaculture) et les compléments alimentaires à base de *Spiruline* ou de *Chlorella*. Cette conception a ensuite été remplacée par une forme allongée généralement appelée raceways (**Figure 9d et 9e**), qui est actuellement la conception générale des bassins ouverts. Cette conception est constituée d'un canal d'écoulement en boucle fermée avec une profondeur de culture typique d'environ 12 à 50 cm (Becker, 1994; Chisti, 2012). Le mélange et la circulation de la culture des microalgues sont généralement assurés par des roues à aubes (**Figure 9e**). La surface des bassins ne dépasse généralement pas 0,5 ha, mais des installations plus grandes existent (Chisti, 2016).

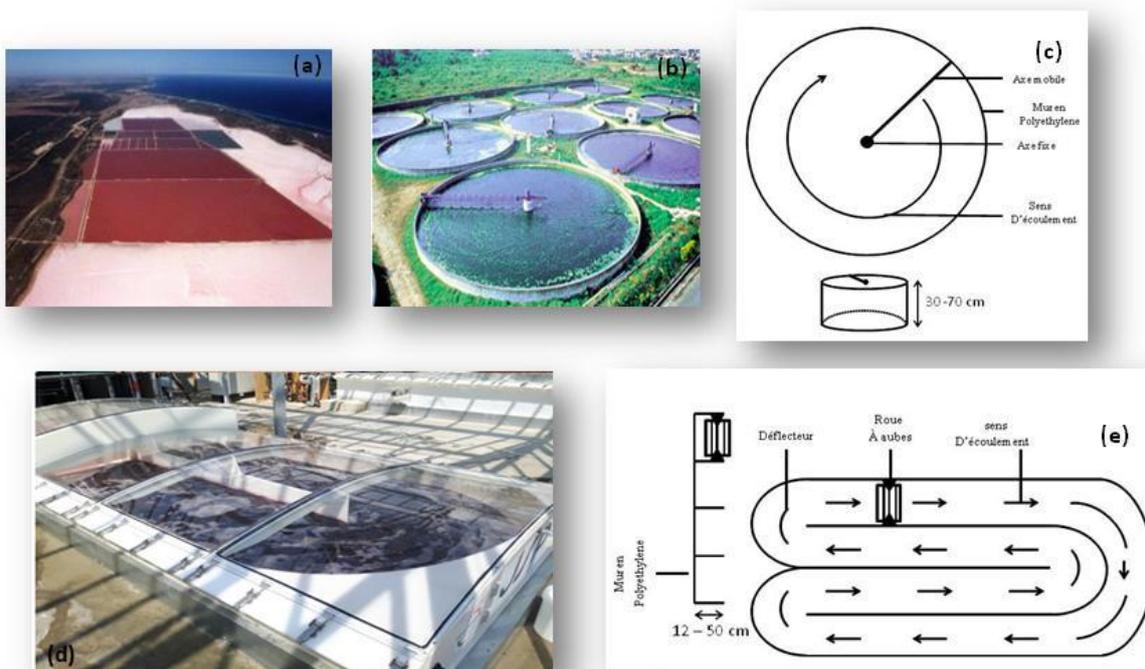


Figure 9: Exemples de culture de microalgues dans des bassins ouverts.

- (a) Bassins sans agitation de *Dunaliella salina* en Australie, (b) culture de *Chlorella* au Japon dans des bassins circulaires, (c) Dessin schématique d'un bassin circulaire, (d) Production industrielle de *Porphyridium cruentum* dans des raceways (AlgoSolis, GEPEA, Université de Nantes, CNRS, France), (e) Dessin schématique d'un raceway

Plusieurs matériaux peuvent être utilisés pour construire les bassins. Le plus économique étant une excavation de terre avec une membrane plastique épaisse, mais la plupart des systèmes sont constituées de murs en béton avec des revêtements en polychlorure de vinyle (PVC), en polyéthylène ou en polypropylène (Chisti, 2012).

Les taux de croissance des microalgues dans les cultures en plein air dépendent dans un premier temps du système de mélange. En effet ce dernier empêche la sédimentation de la biomasse, la stratification de la température et des nutriments et la photoinhibition. Dans les bassins ouverts, la lumière du soleil ne peut venir que par le haut et avec un tel système de mélange, les microalgues ont un meilleur accès à la lumière. En effet, la lumière est un paramètre influençant fortement les taux de croissance des microalgues dans les cultures en plein air. Un flux lumineux incident élevé augmente généralement la productivité, car une irradiance de surface élevée signifie généralement un volume de culture illuminé plus important. Un autre paramètre important pour la productivité de ces systèmes est la disponibilité en CO₂ nécessaire à la croissance des microalgues. Le CO₂ présent dans

l'atmosphère n'est généralement pas suffisant pour une croissance optimale. Il sera alors fourni dans la culture par barbotage de gaz (Godos et al., 2014; Tran et al., 2014). La profondeur du bassin ouvert est alors un paramètre important pour la disponibilité du carbone. Plus l'étang est profond, plus le stockage du dioxyde de carbone est important et plus la perte est faible. Cependant, la profondeur de ces systèmes est généralement insuffisante pour stocker ce carbone de manière efficace, en raison des contraintes de lumière.

Ce système de culture présente également des inconvénients tels que des problèmes de contaminations (par des bactéries, champignons, protozoaires et d'autres microalgues) et de grosses pertes d'eau par évaporation (Chisti, 2007). Les conditions de culture sont peu contrôlables et il existe seulement quelques microalgues assez résistantes pour croître sous ces conditions. Ces microalgues, étant souvent capables de se développer dans des milieux très alcalins (*Arthrospira platensis*), et/ou hypersalins (*Dunaliella salina*) ou encore à des pH très acides, elles sont donc à l'abri des contaminants microbiens (Lee, 2001).

La culture des microalgues rouges dans les systèmes ouverts est par conséquent très peu décrite dans la littérature. Vonshak et al. (1985) ont étudié la culture de *Porphyridium cruentum* dans des bassins ouverts de 130 L réalisés à l'échelle laboratoire. Ils ont trouvé un taux de production quotidien moyen de 10-12 g/m²/j. Ce taux est doublé lorsque la culture est maintenue en chémostat. Cette augmentation de la productivité en biomasse est possible grâce à la réduction de la limitation en lumière. Ces chercheurs estimaient une production de 40-50 tonnes/ha/an de biomasse sèche, ce qui semble être une production acceptable pour les microalgues rouges. Cependant, à mesure que les volumes augmentent dans les cultures à grande échelle, la productivité diminue et le risque de contamination augmente. Par conséquent, l'utilisation de systèmes fermés est privilégiée (Cohen et Arad, 1989).

4.3.2. Système fermé

Afin de pallier aux problèmes rencontrés dans les systèmes ouverts, la culture des microalgues en photobioréacteurs (PBR) a été développée. En effet, ce type de technologie offre un meilleur contrôle des paramètres de culture (température, teneur en dioxyde de carbone et en oxygène, pH), une protection contre les contaminations environnementales, une limitation de l'évaporation et une productivité accrue de la biomasse. Cependant, la production de biomasse dans les systèmes fermés est plus coûteuse par rapport à celle dans des bassins ouverts. De plus, lors de cultures en systèmes fermés, une adhérence importante des cellules peut être observée à la surface des récipients réduisant la transmission de la lumière à l'intérieur de la culture, diminuant le taux de photosynthèse puis la productivité de

la biomasse et conduisant éventuellement à un arrêt précoce de la culture en raison de la mort cellulaire. Cet effet varie en fonction du type de photobioréacteur utilisé et peut être partiellement contrôlé par l'augmentation de l'irradiance et de l'agitation. En effet, on distingue les photobioréacteurs plans, cylindriques, colonne à bulles, tubulaires verticaux (**Figure 10**), tubulaires horizontaux et tubulaires annulaires.

L'utilisation de systèmes fermés pour la culture des microalgues rouges a été étudiée par Cohen et Arad en 1989. Avec ce système, les cultures de *Porphyridium sp.* et *P. aeruginum* ont été réalisées en extérieur et les résultats ont montré une meilleure croissance et production de biomasse pour chaque espèce par rapport aux cultures réalisées dans des bassins ouverts classiques. Cela est principalement dû à une meilleure agitation de la culture, à une plus grande disponibilité de la lumière, au contrôle de la contamination et à la prévention de l'évaporation qui peut entraîner une augmentation de la salinité. Pour la production industrielle, les microalgues rouges sont principalement cultivées dans des PBR tubulaires horizontaux et verticaux ou plats avec la lumière du soleil afin de réduire les coûts. L'inconvénient majeur de cette méthode est l'absence de contrôle de l'intensité lumineuse, la variation quotidienne de la lumière due à l'énergie solaire et la dépendance aux conditions climatiques. Des études sur les variations cycliques quotidiennes de la croissance de *P. cruentum* dans un PBR tubulaire horizontal ont montré une inhibition de l'activité photosynthétique lors d'une intensité lumineuse du soleil plus élevée (Fuentes et al., 1999). Ces inconvénients peuvent être réduits en plaçant les PBR dans des serres mais ils nécessitent un grand système de refroidissement pour compenser la hausse de la température. Il est également possible de travailler sous lumière artificielle mais cela engendrera des coûts supplémentaires.

Dans un PBR plan (**Figure 10**) sous lumière artificielle, le taux de croissance et la production de polysaccharides (PS) à partir de *P. cruentum* ont augmenté avec l'intensité lumineuse (Liqin et al., 2008). Les meilleures productivités de *Porphyridium sp.* ont été observées avec un trajet optique de 1,3 cm mais ont chuté pour des épaisseurs de culture plus élevées, ce qui suggère un manque de disponibilité de la lumière.



Figure 10: Cultures dans différents photobioréacteurs de différentes entreprises.

- (a) *Porphyridium cruentum*, photobioréacteur tubulaire vertical (Greensea, Mèze, France);
 (b) *Porphyridium cruentum*, photobioréacteur plan avec lumière artificielle et
 (c) *Porphyridium cruentum*, photobioréacteur plan incliné en lumière naturelle (AlgoSolis, GEPEA, Université de Nantes, CNRS, France).

En 2017, des cellules de *P. cruentum* ont été déposées sur un disque et cultivées comme un biofilm (Lutzu et al., 2017). Dans ces conditions, la teneur en glucides a augmenté avec le système de culture immobilisée (jusqu'à 42% de matière sèche) par rapport au système de culture en suspension (jusqu'à 35% de matière sèche). Les teneurs en lipides et en protéines ne sont pas influencées par ce mode de culture. Malgré les bons résultats obtenus sur la production de polysaccharides (PS), cette méthode n'est pas encore utilisable pour la production industrielle de biomasse et de PS et des investigations supplémentaires restent nécessaires pour les applications à grande échelle et commerciales.

Certaines technologies de production de microalgues ont également été développées et brevetées. En 1999, une nouvelle conception de PBR a été développée pour produire de la biomasse avec une concentration élevée de pigments, d'acides gras polyinsaturés (AGPI) et de PS (Hirabayashi et al., 1999). Cette invention réalisée avec un matériau transparent avait une forme de dôme, de cône ou de cylindre. Un apport de gaz permet l'agitation de la culture autour d'une source lumineuse et d'optimiser le rendement de la production de biomasse. Les

inventeurs ont revendiqué la possibilité de cultiver une large gamme de microalgues mais n'ont pas fourni d'informations sur l'espèce.

5. Métabolites d'intérêts produits par les microalgues rouges

L'intérêt majeur de la culture des microalgues est la production des molécules à haute valeur ajoutée. En effet, les microalgues rouges sont une source importante de polysaccharides, de pigments mais aussi de protéines et de lipides.

5.1. Protéines et pigments

Les microalgues sont considérées comme une source riche en protéines végétales. En effet, elles produisent une quantité non négligeable de protéines (de 6 à environ à 80% de leurs masses sèches) en fonction des espèces (Becker, 2007). Des études récentes menées par Cian et al. (2015) et réétudiées par Wells et al. (2017) ont mis en évidence le potentiel des protéines des algues rouges, y compris les microalgues, en tant qu'aliments fonctionnels. Par exemple, la teneur en protéines de la biomasse de *P. aeruginum* a été estimée à 31,6% (m/m) et entre 28 et 39% (m/m) pour *P. cruentum* (Becker, 2007; López et al., 2010; Tibbets et al., 2015). Outre les teneurs élevées en protéines, Tibbets et al. (2015) ont également analysé le profil d'acides aminés de *P. aeruginum*, mettant en évidence une quantité élevée d'acides aminés essentiels avec une qualité nutritionnelle potentiellement supérieure à celle de l'albumine d'œuf. Cependant, il n'existe toujours pas de demandes importantes d'extraits de protéines de microalgues purifiées car la présence de composants non protéiques conduit généralement à des changements indésirables dans la couleur ou le goût des protéines. De ce fait, le ratio d'efficacité protéique, la valeur digestive, la couleur et le goût doivent également être pris en compte pour montrer le potentiel nutritionnel des protéines extraites des microalgues. Peu de microalgues (*Chlorella vulgaris*, *Arthrospira platensis*, *Dunaliella sp.*, *Tetraselmis suecica*...) ont été sélectionnées pour la production à grande échelle (protéines, pigments ou autres composants) et l'utilisation commerciale de microalgues rouges pour leurs protéines et/ou la teneur en pigments est beaucoup plus associée à des marchés de niche tels que les marqueurs fluorescents (Glazer et Stryer, 1984) et les colorants naturels (Arad et Yaron, 1992).

Les pigments photosynthétiques sont parmi les métabolites à haute valeur ajoutée pour les microalgues rouges. Les principaux pigments que l'on peut retrouver chez ce type de microalgues sont : (i) la chlorophylle, (ii) les caroténoïdes et (iii) d'autres pigments photosynthétiques accessoires, à savoir les phycobiliprotéines. Les chlorophylles sont des

pigments verts avec des structures planes polycycliques estérifiées par une chaîne latérale de phytol (Pignolet et al., 2013). Ils sont situés dans les thylacoïdes des chloroplastes (Lehninger et al., 2005). Leur distribution est assez simple chez les microalgues. En effet la Chl a est présente chez toutes les algues photoautotrophes. La chl b est présente chez les algues vertes et divers types de chl c se trouvent chez les algues brunes (Stengel et al., 2011). La chlorophylle d (Chl d) a été identifiée chez les Rhodophyta (Ramaraj et al., 2013) (**Figure 10**).

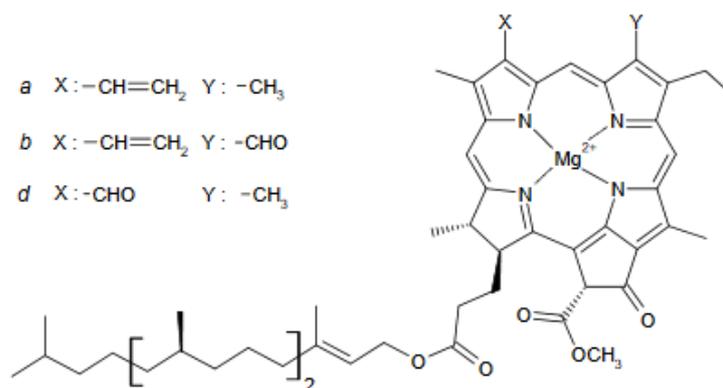


Figure 11 : Structure des chlorophylles (Roy et al., 2011)

Les caroténoïdes peuvent être des carotènes α , β , ϵ et γ (**Figure 11**) ou des composés contenant de l'oxygène appelés xanthophylles (Guedes et al., 2011). Ce dernier groupe est composé de quantités variables de lutéine, de violaxanthine, de spirilloxanthine, de néoxanthine et de fucoxanthine. Leurs schémas de répartition varient selon les espèces. À titre d'exemple, l'alloxanthine, la lutéine, la néoxanthine, la prasinoxanthine, la violaxanthine et la fucoxanthine ne sont pas décrites chez les Rhodophyta contrairement à la zéaxanthine (Serive et al., 2017).

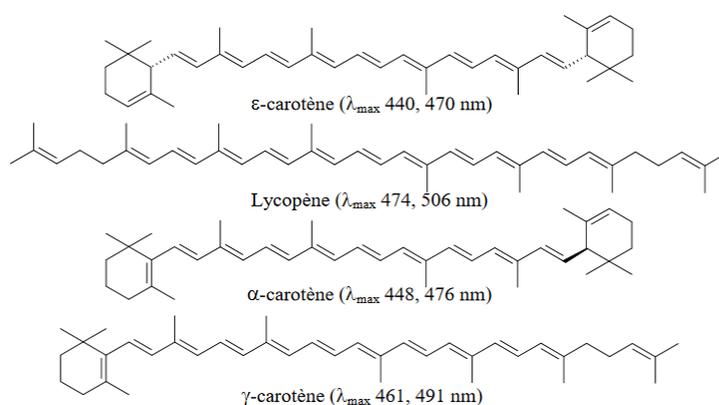


Figure 12 : Structure des carotènes (Roy et al., 2011)

Les phycobiliprotéines sont les principaux pigments des algues rouges, des cyanobactéries, des cryptophytes et des glaucocystrophytes (Munier et al., 2015). Ils assurent l'absorption de la lumière dans des régions de spectres différentes de celles de la chlorophylle, (Llewellyn et al., 2011), comme décrit dans le paragraphe 3.2.2. Leur voie de biosynthèse est divisée en deux étapes. La première étape consiste à la synthèse de l'hème dans le cytoplasme et les mitochondries des cellules microalgales à partir de différents précurseurs à savoir le glutamate, le pyruvate ou le succinyl-CoA. Cette étape est finalisée lorsque la Ferrochélatase intervient avec la protoporphyrine IX (**Figure 12**) (Manirafasha et al., 2016).

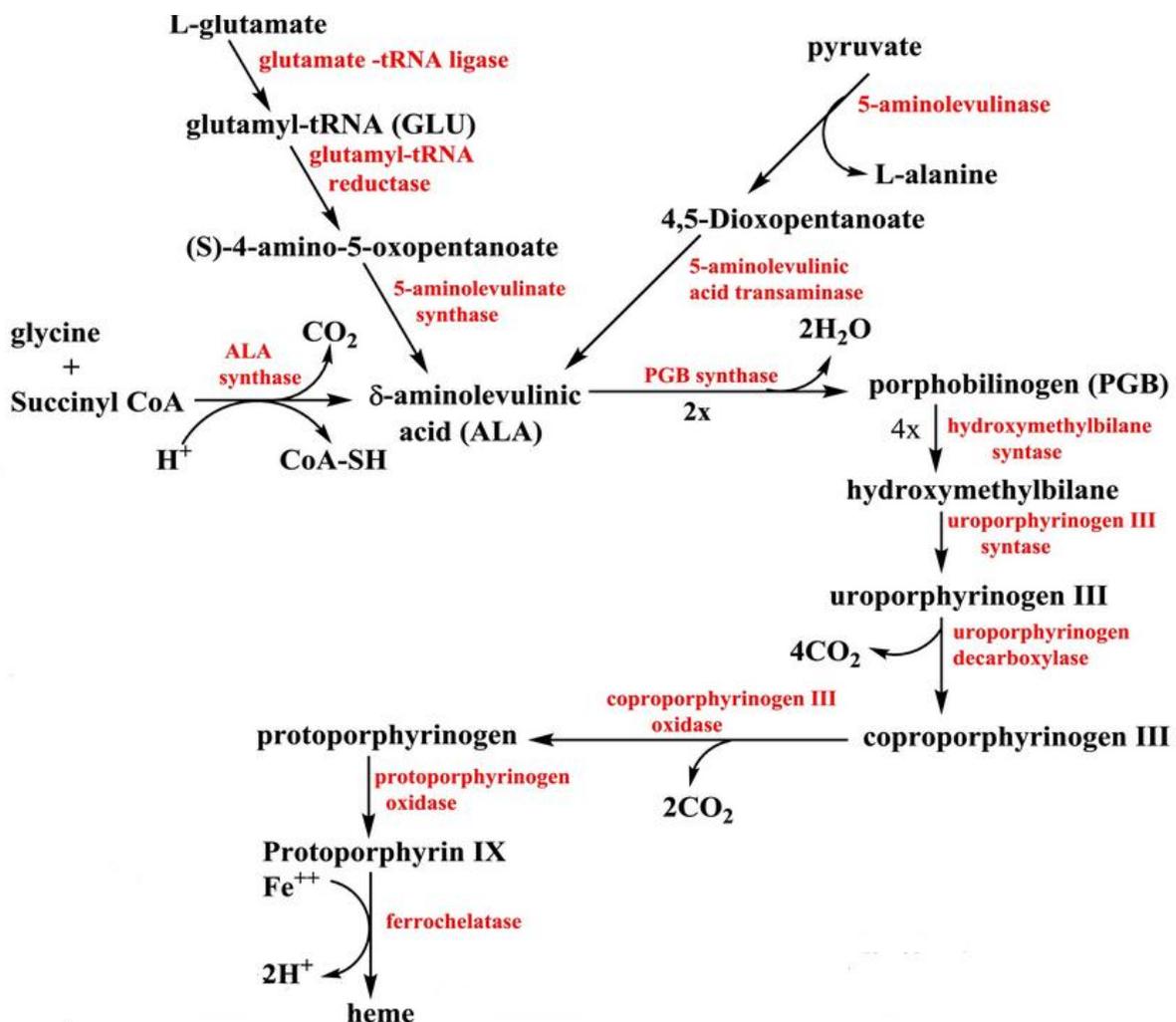


Figure 13 : Voie de biosynthèse de l'hème (Manirafasha et al., 2016)

La synthèse des phycobilines est initiée au cours de la seconde étape par l'action de l'hème oxygénase permettant la conversion de l'hème en biliverdine IXa (BV). La phycocyanobiline synthase (PcyA) catalyse la biliverdine pour former de la phycocyanobiline, ensuite, sous l'action de la ferredoxine oxydoréductase (PebA), la biliverdine est réduite en 15,16-

dihydrobiliverdine qui est à son tour réduite par une deuxième ferredoxine oxydoréductase (PebB) pour former la phycoérythrobiline. La troisième phycobiline synthétisée est la phytochromobiline. Cette réaction est catalysée par la ferredoxine oxydoréductase (H2Y) (**Figure 13**) (Manirafasha et al., 2016 ; Roy et al., 2011).

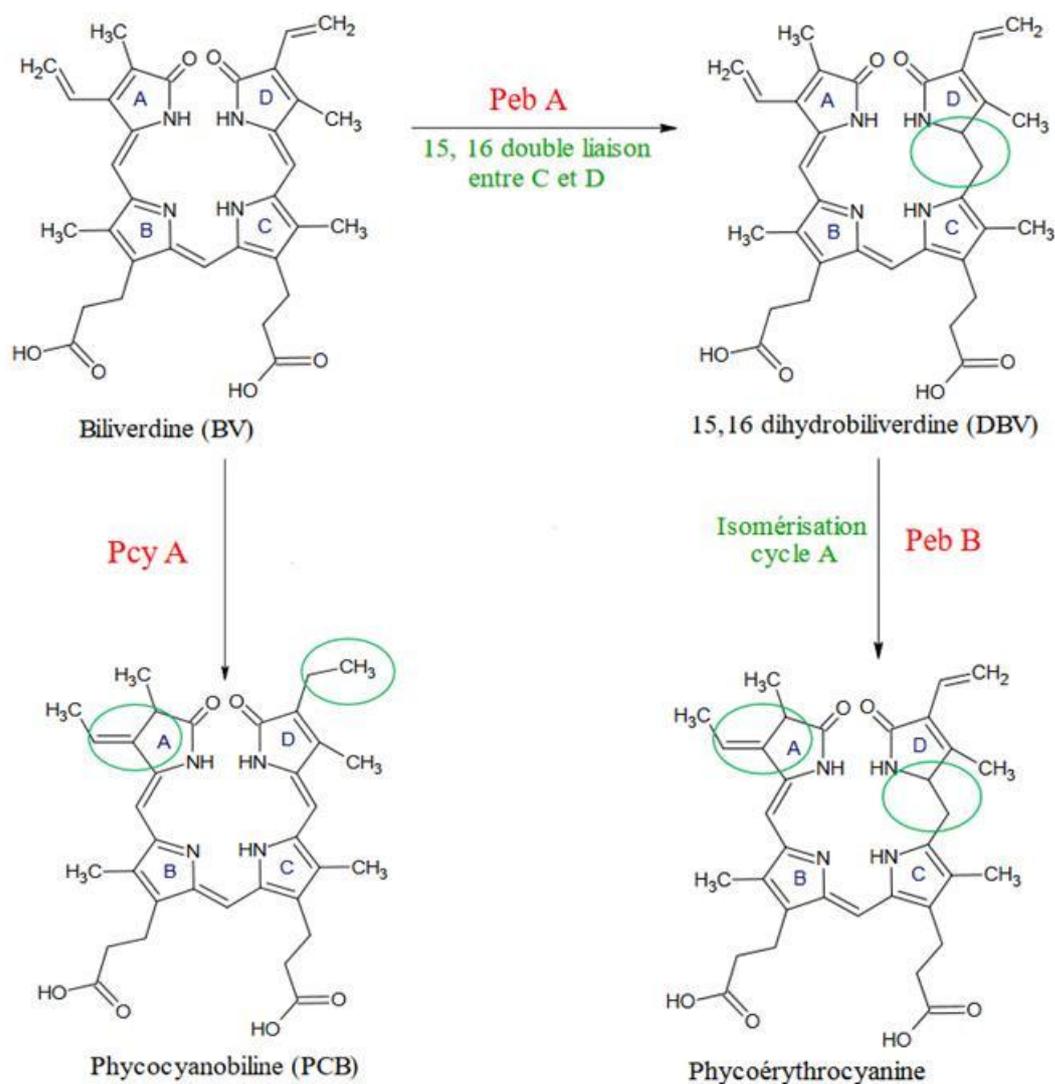


Figure 14: Synthèse de phycocyanobiline et phycoérythrine à partir de biliverdine : PcyA: Phycocyanobiline synthase, PebA et PebB : ferredoxine oxydoréductase (Roy et al., 2011)

Depuis plusieurs années, les phycobiliprotéines ont acquis une importance cruciale dans divers domaines à savoir : le domaine pharmaceutique, médical et alimentaire (Santiago-Santos et al., 2004). Cependant, leur coût de production varie considérablement et dépend de leur rapport de pureté défini par le ratio $A_{\lambda \text{ pigment}}/A_{280 \text{ nm}}$. Pour cette raison et vu sa richesse en B-phycoérythrine, plusieurs études sur *P. cruentum* ont été menées pour développer une procédure de purification efficace et de maximiser par conséquent la pureté et le rendement

commercial de la biomolécule. Les techniques les plus conventionnelles impliquées dans la purification de la B-PE sont la chromatographie en phase liquide à échange d'ions, la chromatographie d'absorption sur lit expansé (Bermejo et al., 2001, 2002, 2003a) et l'ultrafiltration (Tang et al., 2016). Parmi les méthodes les plus adoptées, celle décrite par Bermejo et al. (2002) pour l'espèce *Porphyridium* permet la purification de la B-PE (et de la R-PC) à partir de la biomasse. Le protocole est décrit comme suit :

- (i) une lyse cellulaire (sonication) suivie d'une centrifugation,
- (ii) une filtration du surnageant avant une précipitation avec le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (65%, 12h),
- (iii) une centrifugation, le culot obtenu est resolubilisé dans un tampon spécifique puis dialysé,
- (iv) d'autres centrifugations pour obtenir un surnageant injectable en chromatographie échangeuse d'ions (colonnes DEAE-cellulose) et finalement une collecte des fractions désirées (Bermejo et al., 2002).

En 2006, Benavides et Rito-Palomares ont mis au point un nouveau procédé de purification de phycoerthrine à deux phases afin d'éviter la chromatographie et la précipitation au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Cette approche consiste en une lyse cellulaire par sonication suivie d'une récupération de la B-PE par séparation en deux phases aqueuses en utilisant du poly-éthylène-glycol (PEG). Globalement, le système proposé comprend 29% (m/m) de PEG, 9% (m/m) de phosphate de potassium, 40% (m/m) d'extrait brut de B-PE obtenu après sonication de la biomasse et un pH de 7. Avec ce protocole, 90% de la B-PE a été récupérée dans la phase riche en PEG avec une pureté de 3,2.

Les EPS et les polysaccharides attachés aux cellules constituent le principal inconvénient limitant ces processus de purification de la B-PE car ils modifient la solubilité de ce pigment et le comportement des microalgues rouges au cours de leur lyse (Jubeau et al., 2013). Pour éviter ce phénomène, seules les cellules en phase de croissance exponentielle sont généralement utilisées pour extraire et purifier la B-PE (Jubeau et al., 2013). Par conséquent, en 2014, Marcati et al. ont mis au point un procédé membranaire en deux étapes. Avec cette méthode, les auteurs ont co-extrait l'EPS et la B-PE en utilisant une ultrafiltration tangentielle avec plusieurs seuils de coupure (300 kDa et 10 kDa). Cette procédure a permis aux auteurs d'extraire la B-PE avec un IP (indice de pureté) faible de 2,3 et un rendement de 48% mais à un coût moindre.

5.2. Les polysaccharides

Les polysaccharides sont les macromolécules les plus répandues dans la nature. Ils sont trouvés aussi bien chez les animaux que chez les végétaux. Ce sont alors des polymères constitués de plusieurs oses liés entre eux par des liaisons osidiques et dont la taille peut atteindre plusieurs millions de g/mol. Selon leur degré de polymérisation, ces polymères sont classés en deux catégories : les oligosaccharides composés de 2 à 10 monosaccharides et les polysaccharides constitués de plus de 10 monosaccharides. On distingue aussi deux catégories de polysaccharides : les homopolysaccharides constitués du même monosaccharide (amidon, celluloses, fructanes, glucanes, galactanes, mannanes...) et les hétéropolysaccharides formés de différents oses (hémicelluloses, pectines...). Selon la disposition de leur chaîne, les polysaccharides peuvent être soit linéaires soit ramifiés. Tous ces paramètres participent alors à leur diversité.

Les polysaccharides sont très répandus chez les microalgues rouges, mais ils sont très peu exploités à nos jours malgré leur composition originale en monosaccharides et leurs propriétés physico-chimiques, rhéologiques et biologiques remarquables. En général, deux familles de polysaccharides sont décrites chez les microalgues à savoir le polysaccharide de réserve et le polysaccharide structurel incluant les exopolysaccharides et les polysaccharides liés à la paroi cellulaire.

Comme décrit dans la littérature, le polysaccharide de réserve chez les rhodophytes est l'amidon floridéen. Il s'agit d'une structure en α -polyglucane similaire à l'amidon mais dépourvu d'amylose (Usov, 2011). Néanmoins, des différences structurelles ont été mises en évidence entre les espèces macro- et microphytes. Ainsi, la présence d'amylose a été détectée pour certaines microalgues rouges telles que *P. aeruginum*, *P. purpureum*, *P. sordidum*, *Rhodorus marinus*, *Rhodella violacea*, *Flintiella sanguinaria* (McCracken et Cain, 1981; Shimonaga et al., 2008, 2007) dont la teneur varie selon les espèces. Par exemple, la teneur en amylose dans l'amidon de *P. purpureum* était inférieure à 10% (Shimonaga et al., 2007), mais elle pourrait représenter jusqu'à 23% chez *F. sanguinaria* (McCracken et Cain, 1981). Pour ces souches, le terme « semi-amylopectine » est généralement préféré. Par ailleurs, chez les cyanidales, les genres *Cyanidium* et *Galderia* présentent des polysaccharides de réserve assimilés à du glycogène (Shimonaga et al., 2008, 2007), alors que celui du genre *Cyanidioschyzon* se rapproche davantage de l'amidon floridéen (Hirabaru et al., 2010). De plus, les analyses de la longueur de la chaîne, de la cristallinité et du degré de ramification ont mis en évidence des différences significatives avec les glucides de réserve des microalgues

vertes (amidon) des cyanobactéries (glycogène) et avec l'amidon floridéen (Shimonaga et al., 2008, 2007). Par exemple, les auteurs Shimonaga et al. (2007) ont montré que *P. purpureum* synthétise un polyglucane de type semi-amylopectine avec une structure moins ordonnée par rapport à l'amylopectine synthétisé par les plantes supérieures et les algues vertes. Ceci a été mis en évidence par le faible degré de cristallinité du polyglucane de *P. purpureum* par rapport à celui de *Chlorella* et du riz, obtenu à partir du diagramme de diffraction des rayons X. De plus, il a été montré que les proportions des chaînes courtes ($DP \leq 8$) et des chaînes longues ($DP \geq 37$) dans le polyglucane de *P. purpureum* étaient intermédiaires entre celles de l'amylopectine du riz, le glycogène de *Synechococcus sp.* PCC7942, et similaires à celles du semi-amylopectine de *Cyanobacterium sp.* MBIC10216. En outre, les températures de gélatinisation des α -glucanes chez les Porphyridiales étaient différentes de celles du Chloroplastida (les végétaux verts dont les plantes terrestres et les algues vertes). Ces résultats ont indiqué que les α -polyglucanes des Porphyridiales, y compris le glycogène et la semi-amylopectine, ne présentaient pas la même structure standard observée au sein du Chloroplastida (Shimonaga et al., 2008). La principale différence entre l'amidon, le glycogène et l'amidon floridéen est leur localisation dans la cellule. En effet, l'amidon des algues vertes est présent (formation et stockage) dans le plastide, tandis que l'amidon floridéen et le glycogène sont localisés dans le cytosol (Usov, 2011; Yu et al., 2002).

En plus du polysaccharide de réserve, les cellules des microalgues rouges sont encapsulées dans une gaine mucilagineuse qui représente le polysaccharide structurel de la cellule (Arad et Levy-Ontman, 2010). Une partie de ces polysaccharides est excrétée dans le milieu sous forme d'exopolysaccharides (EPS) et leur accumulation durant la phase stationnaire rend le milieu de culture très visqueux. Néanmoins, 50 à 70% de PS restent autour de la cellule pendant leur croissance pour former l'exopolysaccharide lié à la membrane cellulaire, et que l'on trouve dans la littérature sous le nom de BPS (« Bound Polysaccharide ») ou CPS (« Capsular Polysaccharide ») (Geresh et Arad, 1991 ; Singh et al., 2000). La fonction physiologique des EPS reste ambiguë même si le rôle principal décrit dans la littérature semble être la prévention des microalgues contre le phénomène de dessiccation et la protection contre une multitude de conditions environnementales (Arad et Levy-Ontman, 2010; Delattre et al., 2016; Pignolet et al., 2013; Ramus, 1981). Les exopolysaccharides des microalgues rouges les plus étudiés ont été produits et extraits de *Rhodella reticulata*, *Porphyridium sp.*, *P. aeruginosum* et *P. cruentum* (Delattre et al., 2016; Geresh et Arad, 1991 ; Geresh et al., 2009, 1992, 1990; Gloaguen et al., 2004). En effet, ces Rhodophyta produisent

des structures complexes d'exopolymère sulfaté. Ce sont des polymères de grandes tailles avec une masse molaire comprise entre 8×10^5 et 26×10^5 g/mol (Capek et al., 2008 ; Nosálová et al., 2012 ; de Jesus Raposo et al., 2013). Actuellement, les structures spécifiques de ces hétéropolysaccharides complexes de haut poids moléculaire ne sont pas totalement définies. Ces EPS sont principalement composés de PS sulfaté anionique composé d'acide glucuronique et de plusieurs sucres neutres majeurs tels que le xylose, le galactose et le glucose (Arad et Levy-Ontman, 2010; Geresh et Arad, 1991 ; Gloaguen et al., 2004). Il est généralement admis que les EPS provenant de microalgues rouges sont sulfatés, avec une teneur en sulfate comprise entre 1 et 14% (en poids) (de Jesus Raposo et al., 2013; Geresh et Arad, 1991; Roussel et al., 2015; Soanen et al., 2016; Villay et al., 2013). Cependant, il faut mentionner que très peu d'études ont été menées sur des espèces autres que *Porphyridium* et *Rhodella*. Ainsi, ces caractéristiques structurales peuvent être très différentes pour d'autres microalgues rouges. À titre d'exemple, la caractérisation récente de l'EPS de *Flintiella sanguinaria* n'a montré aucun groupe sulfate (<0,6% m/m), mais un polymère méthylé à 5,1% (m/m) et acétylé à 3,2% (m/m) (Gaignard et al., 2018). Jusqu'à présent, seules quelques études publiées par certains auteurs ont élucidé la structure partielle des EPS provenant de microalgues rouges (Delattre et al., 2016; Geresh et al., 2009). En effet, Geresh et al., 2009 ont étudié la structure de l'exopolysaccharide de *Porphyridium sp.* Cet exopolymère est composé en partie de l'unité de répétition suivante : [(2 ou 4)- β -D-Xylp-(1 \rightarrow 3)]_n- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- α -D-GlcpA-(1 \rightarrow 3)-L-Galp(1 \rightarrow X qui est rattaché à un squelette principal de structure encore non décrite.

Après une optimisation des conditions de production des polysaccharides, il est nécessaire de développer une stratégie d'extraction économique, efficace et environnementale pour obtenir des EPS à haut degré de pureté et pour pouvoir par la suite étudier leur structure et les utiliser dans des applications industrielles. En effet, plusieurs méthodes ont été développées pour l'extraction des polysaccharides à partir des microalgues rouges. La première, proposée en 1972 par Ramus pour isoler l'exopolysaccharide lié à la membrane cellulaire de *Porphyridium*, consistait à dissoudre l'EPS dans de l'eau chaude après une dépigmentation initiale de la microalgue dans le solvant acétone/éthanol. Une étape de précipitation spécifique des EPS a été par la suite effectuée en utilisant une solution de chlorure de cétyle pyridinium (CTAB). Dans la dernière étape, l'EPS a été purifié sélectivement par traitement à l'éthanol. Récemment, plusieurs autres méthodes ont été mises au point pour extraire les polysaccharides (Delattre et al., 2016). Il est généralement décrit dans la littérature qu'après la première étape de la culture des microalgues sous des conditions optimisées (salinité,

irradiance, température, pH, ...), la majeure partie de la fraction EPS est solubilisée dans le milieu de culture. Une deuxième étape (récolte) impliquant la récupération des EPS a été développée en utilisant la microfiltration ou la centrifugation afin de séparer la biomasse et le surnageant de culture (Delattre et al., 2016; Patel et al., 2013; Ye et al., 2005; Liu et Fang, 2002). Enfin, une récupération sélective de l'EPS peut être réalisée par précipitation avec de l'isopropanol ou de l'éthanol (Delattre et al., 2016; Patel et al., 2013; Usov, 2011). L'inconvénient majeur de ce processus est la co-précipitation des sels avec les exopolysaccharides, surtout pour les microalgues cultivées dans des milieux de culture fortement salés comme *Porphyridium sp.* Afin de contourner ce problème, une autre technique efficace a été développée en utilisant la dialyse ou l'ultrafiltration tangentielle pour dessaler l'EPS extrait de microalgues rouges. En effet, Patel et al. (2013) ont montré que l'ultrafiltration tangentielle réalisée avec une membrane de filtration en polyéthersulfone (PES) avec un seuil de coupure (MWCO) de 300 kDa était une approche plus efficace pour extraire et purifier l'EPS de *P. cruentum* par rapport aux précipitations alcooliques. De plus, Marcati et al. (2014) ont proposé un procédé de purification optimisé du polysaccharide en utilisant deux étapes d'ultrafiltration avec des membranes PES ayant des MWCO de 10 et 300 kDa.

5.3. Les lipides

Les microalgues contiennent une grande variété d'acides gras dont la composition varie selon les espèces. La teneur en lipides peut aller de 16% à 75% de leur poids sec dont 14% sont représentés par les acides gras polyinsaturés à longue chaîne (Harun et al., 2010). Les microphytes les plus étudiés aujourd'hui, notamment pour la transformation des lipides en biocarburants, sont les microalgues vertes (*Chlorella*, *Chlamydomonas...*), la cyanobactérie *Arthrospira platensis* et les microalgues dites oléagineuses telles que *Botryococcus braunii*, *Dunaliella sp.* ou *Nannochloropsis sp.* Récemment les microalgues rouges ont eu l'attention de plusieurs chercheurs pour leur production de lipides. Toutefois, la plupart des études se limitent à la microalgue rouge appartenant au genre *Porphyridium*. Il a été démontré que ces microalgues produisent des AGPI à longue chaîne appartenant à la série des omegas 3 (ω 3) tels que les acides eicosapentaénoïque (EPA – 20:5) et docohexaénoïque (DHA – 22:6) (Borowitzka, 1988; Becker et al., 1994) et à la série des omegas 6 (ω 6) tel que l'acide arachidonique (AA – 20: 4) qui a été identifié chez *P. cruentum* (Ahern et al., 1983; Cohen et al., 1995).

La production des lipides chez les microalgues rouges est affectée par plusieurs facteurs à savoir la lumière, la température, ainsi que la composition du milieu de culture. En effet, Ivanova et al. (2015) ont montré que la teneur en EPA de *Rhodella reticulata* peut atteindre 46% (m/m) des acides gras totaux lorsqu'elle est cultivée à 27 °C. De plus, dans le cas de *Porphyridium sordidum*, la teneur en EPA augmente progressivement de 14 à 28% à faible intensité lumineuse (150 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$) (Mihova et al., 1997). La composition du milieu de culture peut également avoir un impact sur le taux de lipides. En effet, l'étude de Kavitha et al. (2016) sur *Porphyridium purpureum* a montré qu'une augmentation modérée des taux de chlorure, de sulfate, de nitrate et de phosphate favorisait un meilleur rendement de production de biomasse, mais que des concentrations beaucoup plus élevées de ces mêmes composants entraînaient une production maximale de lipides et notamment d'EPA (Kavitha et al., 2016).

6. Valorisation des microalgues rouges

Comme décrit ci-dessus, les microalgues produisent des molécules d'intérêts technologiques potentiels tels que les protéines, les lipides, les pigments et les polysaccharides. Ces métabolites ont été étudiés et caractérisés pour être utilisés à des fins industrielles dans divers domaines : bioénergie, alimentation humaine ou animale, pharmaceutique et cosmétique.

Contrairement aux microalgues rouges, seules les Chlorophycées (*Chlorella*, *Spirulina*, *Dunaliella*) sont, depuis plusieurs décennies et jusqu'à présent, les plus exploitées industriellement pour leurs bienfaits nutritionnels. Cependant, ces dernières années, les chercheurs ont exploré les Rhodophycées, particulièrement les espèces appartenant au genre *Porphyridium* et *Rhodella*, pour leur richesse en exopolysaccharides et en phycobilibiprotéines.

6.1. Valorisation de la biomasse microalgale et des pigments photosynthétiques

La biomasse des microalgues rouges a été décrite comme un agent hypoglycémique et hypocholestérolémiant. Les propriétés antihyperlipidémiques de la biomasse provenant de *Porphyridium sp.* ont été évaluées par Ginzberg et al. (2000). Ils ont découvert que la biomasse microalgale diminue les taux de cholestérol dans le sang et le jaune d'œuf des poulets. En outre, elle modifie le profil des acides gras et contribue à l'augmentation de la teneur en caroténoïdes dans le jaune d'œuf. Le même résultat a été trouvé dans les études de Dvir et al. 2000 où ils ont montré que l'ajout de la biomasse de *Porphyridium* et de *R. reticulata* dans l'alimentation des rats réduit les taux de cholestérol, de triglycérides et de

VLDL dans le sérum tout en améliorant le taux de cholestérol hépatique. Ces activités antihyperlipidémiques sont dues aux fibres alimentaires et aux polysaccharides sulfatés contenus dans la biomasse algale. Tous ces résultats devraient encourager l'utilisation de microalgues rouges comme un aliment fonctionnel.

La biomasse produite par les Rhodophyta est riche en molécules de grande valeur ajoutée parmi lesquelles on cite les pigments fluorescents qui sont largement utilisées dans le domaine pharmaceutique. Ces molécules fluorescentes, après extraction et purification, présenteraient plusieurs activités biologiques bénéfiques à savoir des activités anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti-obésités, anti-cancérigènes, antivirales, hépatoprotecteurs, neuroprotecteurs et immunomodulateurs (Manirafasha et al., 2016 ; Pangestuti et al., 2011). Par exemple, la prévention de la maladie du foie, l'hépatite, causée par un virus (Gerlach et al., 2003 ; Lavanchy, 2004), peut être traitée par les phycobiliprotéines en raison de leurs activités anti-virales et anti-inflammatoires comme démontrées par Romay et al. (2003), Murugan et Radhamadhavan (2011) et Murugan (2011). Par conséquent, d'après Manirafasha et al. (2016), les travaux futurs sur le développement de médicaments et de vaccins à partir de phycobiliprotéines pour la prévention et le traitement des maladies virales aiguës en général, et l'hépatite, Ebola, la grippe, les cancers, le VIH / SIDA en particulier, présenteraient un intérêt médical important. De plus, Pan et al. (2013) ont rapporté que le pigment R-PE extrait de *Porphyra haitanensis* a une activité antitumorale en raison de ses propriétés antioxydantes et sa capacité à stimuler l'expression du gène de la protéase et de TNF- α engendrant l'apoptose des cellules cancéreuses.

Les phycobiliprotéines sont aussi des fluorophores de haute qualité utilisées dans divers domaines biotechnologique. En effet, en raison de leurs propriétés fluorescentes et leurs propriétés physico-chimiques exceptionnelles à savoir la photostabilité et leur haute solubilité dans l'eau, les phycobiliprotéines sont considérées comme des sondes fluorescentes les plus efficaces (Sun et al., 2003 ; Munier et al., 2014). Trois phycobiliprotéines, notamment la R-phycoérythrine, la B-phycoérythrine et l'allophycocyanine, servent de marqueurs fluorescents précieux pour de nombreuses applications en cytométrie en flux, microscopie, histochimie et, dans une moindre mesure, en détection d'espèces réactives à l'oxygène (Glazer, 1994). Les phycoérythrines et en particulier la B-phycoérythrine et la R-phycoérythrinesont considérées comme les fluorophores les plus brillants au monde en raison de leur fluorescence intense, de leur aptitude à être excitée en tant que fluorescéine et de leur rendement quantique élevé. De plus, la phycoérythrine est compatible avec les lasers couramment disponibles et donne des

résultats exceptionnels en cytométrie en flux, en coloration immunofluorescente, et produit moins d'interférences (Ducret et al., 1994 ; Telford et al., 2001). A titre d'exemple, B-PE, le pigment le plus abondant dans l'espèce de microalgues rouges *Porphyridium* (Marcati et al., 2014), a été industrialisé comme un colorant fluorescent pour la cytométrie en flux et la coloration immunofluorescente en raison de son unique couleur rose fluorescente (Bermejo et al., 2007, 2003b ; Richa et al., 2011).

Les phycoérythrine ont été également exploitées en tant que colorants naturels dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques tout en remplaçant les colorants synthétiques. En effet, elles n'ont montré aucune toxicité et propriétés cancérigènes. Cependant, leur utilisation dans les aliments nécessite une connaissance détaillée de la stabilité de la couleur vis-à-vis de la chaleur, de la lumière et du pH (Manirafasha et al., 2016).

6.2. Valorisation des exopolysaccharides

Étant donné que les EPS de microalgues rouges sont des biopolymères sulfatés, ils ont souvent été décrits comme porteurs d'activité biologique. Ces activités ont attiré l'attention de plusieurs chercheurs (Arad et Levy-Ontman, 2010 ; de Jesus Raposo et al., 2013). De plus, il a été constaté que les EPS provenant de microalgues rouges ont de nombreuses applications potentielles telles que les applications alimentaire, cosmétique et pharmaceutique et ceci en raison de leur pouvoir antiviral, antitumoral, antibactérien, biosurfactant, bioémulsifiant... (**Tableau 2**). A titre d'exemple, la société Solazyme a développé une composition nutraceutique aux propriétés antioxydantes basées sur l'utilisation de polysaccharides produits par les microalgues rouges appartenant au genre *Porphyridium* (Dillon et al., 2006). Cette formulation permet de réduire l'inflammation et de prévenir les dommages oxydatifs dans les tissus de mammifères. En 2012, Bayona et al. ont également suggéré que l'EPS produit par *P. cruentum* peut être utilisé comme ingrédient actif dans des compositions cosmétiques et pharmaceutiques. En effet, il a été démontré que ce PS était capable d'une part de diminuer significativement l'activité de l'hyaluronidase d'environ $96,6 \pm 0,3\%$ avec une concentration allant de 0,25 à 2,5 mg/mL, et d'autre part, de réduire l'activité de l'élastase d'environ $46 \pm 7,1\%$ à une concentration de 5 mg/ml. A l'égard de ces résultats, les auteurs ont alors suggéré que l'EPS de *P. cruentum* puisse être utilisé comme ingrédient actif dans les formulations cosmétiques afin de maintenir un bon aspect de la peau. Cette activité est désormais brevetée par la société Solazyme depuis 2014 (Dillon et al., 2014). En 1995, Arad et Huliheil ont affirmé que l'EPS provenant de microalgues rouges est un agent antiviral

efficace protégeant contre une infection virale, en particulier les virus de la varicelle et du zona. Ce brevet revendiquait également une formulation d'un ou plusieurs EPS de *Porphyridium sp.*, *P. aerugineum* et *Rhodella reticulata* prévenant une infection virale et une réplication. Les EPS de microalgues rouges appartenant au genre *Porphyridium* et *Rhodella* ont également été utilisées avec succès comme agent antiparasitaire lors d'une infection des abeilles par la microsporidie *Nosema ceranae* (Roussel et al., 2015).

Toutes ces activités démontrées par plusieurs chercheurs dépendent des caractéristiques physico-chimiques des exopolysaccharides telles que le degré de sulfatation, le poids moléculaire, le type de sucres et la ramification glycosidique. Par exemple, les polysaccharides de *P. cruentum* (Sun et al., 2009) et de *Porphyridium sp.* (Tannin-Spitz et al., 2005) et leurs oligomères obtenus par dégradation par micro-ondes ont un pouvoir antioxydant intéressant. Ils combattent les espèces réactives de l'oxygène produites sous l'influence de fortes radiations lumineuses. Les EPS de *P. cruentum* sont également décrits pour leur activité anti-tumorale et immunomodulatrice (Sun et al., 2012). Ils améliorent la réponse immunitaire en stimulant la prolifération des macrophages et des lymphocytes. Ces activités biologiques sont plus importantes pour les petites molécules ($PM = 6,55 \cdot 10^4$ g/mol) que pour les molécules de tailles supérieures ($PM = 2,56 \cdot 10^5$ g/mol). De plus, Arad et Levy-Ontman (2010) ont observé une relation linéaire entre le degré de sulfatation du polysaccharide de *Porphyridium* et son activité antivirale contre l'herpès. Néanmoins, si la présence des groupements sulfate semble impliquée dans un certain nombre d'activités biologiques, le degré de sulfatation seul n'est pas un élément suffisant pour qu'un EPS soit actif. En fonction des activités biologiques testées, la position de ces substituants sur la structure pourrait jouer un rôle (Roussel et al., 2015 ; Ropellato et al., 2015).

Tableau 2: Principales applications des exopolysaccharides provenant de microalgues rouges

Activités	Espèces	Fonctions	Mode d'action	Références
Antivirus	<i>Porphyridium</i> sp. <i>Porphyridium aerugineum</i> <i>Rhodella reticulata</i>	Retrovirus Herpes simplex virus (HSV) Varicella zoster virus (VZV)	(1) Caractère anionique des EPS contre les virus (2) Inhibition de l'attachement / adsorption (3) Inhibition de la pénétration des particules virales dans les cellules hôtes (4) Inhibition de la réplication du virus pendant les premières phases de l'infection virale (5) Prévention de la formation de diverses transcriptases inverses rétrovirales sans effets cytotoxiques contre les cellules hôtes	Huleihel et al. (2001); Fabregas et al. (1999b); Hasui et al. (1995); Martinez et al. (2005); Kim et al. (2012)
	<i>Porphyridium cruentum</i>	Septicémie hémorragique virale (VHS) chez les poissons de type salmonidés et les maladies virales chez les mammifères		
Anti-inflammatoire	<i>Porphyridium</i>	Inflammation cutanée	Inhibition de la migration/adhésion des leucocytes polymorphonucléaires	Matsui et al. (2003)
Antibactérienne	<i>Porphyridium cruentum</i>	Activité antibactérienne contre <i>Salmonella</i> Enteritidis	Action antibiofilm qui bloque l'adhésion des agents pathogènes aux cellules hôtes	de Jesus Raposo et al. (2014)
Antioxydante	<i>Porphyridium cruentum</i>	Prévient l'accumulation et l'activité des radicaux libres et des espèces chimiques réactives	Piégeage des radicaux libres et transport des cellules vers le milieu	Tannin-Spitz et al. (2005)
Antitumorale	<i>Porphyridium cruentum</i>	Inhibe la prolifération des cellules antitumorales sur les tumeurs S180 dans des modèles de souris	(1) Renforcement du système immunitaire induit par l'EPS (2) Régler les voies de signalisation cellulaire (3) Bloque l'interaction entre les cellules cancéreuses et les cellules hôtes	Sun et al. (2012)
Biolubrifiant	<i>Porphyrdium</i>	Pouvoir lubrifiant: substitut d'acide hyaluronique		Arad and Weinstein (2003); Arad et al. (2006)
Antiparasitaire	<i>Porphyridium purpureum</i> <i>P. marinum</i> <i>Rhodella violacea</i> <i>R. maculata</i>	Protection des abeilles contre les espèces de <i>Nosema</i>		Roussel et al., (2015)
Cosmétique	<i>Porphyridium</i> sp. <i>P. aerugineum</i> <i>R. reticulata</i>	Stabilise la structure du gel d'aloë vera et prolonge sa durée de vie		Yaron et al. (1992)
Traitement des eaux usées	<i>R. reticulata</i>	Élimine les ions toxiques des eaux usées industrielles	Charge négative (due à la présence de groupes acide glucuronique et sulfates)	Geresh et al. (1997)

Matériel et Méthodes

1. Souche et conditions de culture

La microalgue rouge utilisée au cours de ce travail de thèse est *Porphyriidum marinum* Kylin (1937) CCAP 1380/10 obtenue auprès la collection des algues et des protozoaires (Culture Collection of Algae and Protozoa (<http://www.ccap.ac.uk/>)).

1.1. Milieu de culture

Le milieu de culture Pm décrit par Soanen et al. (2016) a été utilisé pour la culture de la microalgue rouge *P. marinum*.

Le milieu Pm contient:

NaCl	28 g
NaNO ₃	1,7 g
K ₂ HPO ₄	0,9 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	7,2 g
CaCl ₂ , 2H ₂ O	1,55 g
Solution métallique (SM)	1 mL
Solution vitaminique (SV)	1 mL
Eau distillée qsp	1000 mL

La solution métallique est composée de :

MnSO ₄ , H ₂ O	0,15 g/L
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ , 4H ₂ O	0,015 g/L
CoSO ₄ , 7H ₂ O	0,015 g/L
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,05 g/L
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,25 g/L
Fer-EDTA	10 g/L
Eau distillée qsp	1000 mL

La solution vitaminique est composée de :

Vitamine B12	0,01 g
Thiamine	0,025 g
Biotine	0,04 g
Eau distillée qsp	1000 mL

La procédure pour préparer le milieu de culture Pm consiste à ajuster d'abord le pH entre 8 et 8,5 puis à le filtrer sur le système de filtration sous vide Stericup à 0,22 μm . Les solutions SM et SV sont ajoutées au milieu après une filtration stérilisante à 0,22 μm .

1.2. Conditions de culture de la souche *Porphyridium marinum*

Trois conditions de culture en autotrophie, mixotrophie et hétérotrophie ont été testées pour la culture de *P. marinum*. En condition autotrophique et mixotrophique, la microalgue a été cultivée sous une lumière continue de 25 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$. Tandis que la culture hétérotrophique s'est déroulée en absence totale de lumière.

La source de carbone utilisée pour les conditions mixotrophique et hétérotrophique est l'acétate à une concentration de 1 g/L. Afin d'éviter une limitation en acétate de sodium, ce dernier a été ajouté en « fed-batch » dans la culture.

Toutes les cultures ont été maintenues sous agitation continue de 110 rpm et à une température de 20 °C.

1.3. Suivi de la cinétique de croissance

La croissance cellulaire de *P. marinum* est déterminée par comptage en utilisant une cellule de Malassez. Dans notre cas, les cellules sont tout d'abord soumises à des ultrasons (sonicateur U50 control, IKA® Labortechnik) à 20% d'amplitude sous 5x2 cycles de 2 s afin de dissocier les agrégats cellulaires. Les microalgues sont ensuite comptées sur 10 carrés de 0,01 μL et la concentration cellulaire est rapportée en nombre de cellules par mL.

2. Extraction des métabolites

2.1. Extraction des exopolysaccharides

Les cultures ont été centrifugées à 10000 g pendant 30 min à 20 °C afin d'éliminer la biomasse microalgale. Le surnageant a été par la suite dessalé à l'aide d'une cassette de filtration tangentielle (vivaflow 200) ayant un seuil de coupure de 100 kDa. La diafiltration a été arrêtée quand la conductivité du filtrat était inférieure à 2 $\mu\text{S/cm}$. Finalement, la solution d'EPS obtenue a été concentrée en utilisant le même système et lyophilisée avant stockage à température ambiante.

2.2. Extraction des protéines

Cinquante milligrammes de la biomasse totale sèche ont été re-suspendus dans 10 mL d'eau distillée. Après homogénéisation du mélange, les cellules sont lysées à l'aide d'un

broyeur cellulaire à haute pression (2,7 kbars). Les protéines solubles sont récupérées dans le surnageant après une centrifugation à 10000 g pendant 30 min à 4 °C du mélange broyé.

2.3.Extraction des lipides

L'extraction lipidique totale a été réalisée à partir de la biomasse sèche selon la méthode de Bligh et Dyer (1959) modifiée. Deux cent milligrammes de cellules sèches sont incubés avec 7 mL d'un mélange chloroforme/méthanol/eau (4/2/1 v/v/v). Le mélange est vortexé vigoureusement, puis centrifugé pendant 10 min à 2000 g et la phase organique est prélevée et déposée dans un tube préalablement séché et pesé. Le solvant est évaporé pendant 6h à 40 °C à l'aide d'un SpeedVac. La teneur en lipides est calculée en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Teneur en lipides (\%)} = \text{ML} / \text{MA} \times 100\% \quad (1)$$

Avec ML est la masse des lipides extraits (correspondant à la différence de masse des tubes vides et contenant les lipides secs) et MA la masse de biomasse algale sèche.

2.4.Extraction des pigments

2.4.1. Extraction des pigments liposolubles

Les teneurs en pigments liposolubles de *P. marinum* ont été déterminées à partir de la fraction lipidique extraite selon le protocole décrit ci-dessus. En effet, les lipides ont été dissous dans 1 mL d'acétone pure, puis l'absorbance a été mesurée à 400-700_{nm} sur un Spectrophotomètre UV-Visible S-630. Selon Lichtenthaler (1987), la chlorophylle a, la chlorophylle b et les caroténoïdes totaux présentent une absorbance (A) maximale à 661,6, 644,8 et 470_{nm}, respectivement. Les concentrations de ces pigments peuvent ensuite être calculées selon les formules suivantes (Lichtenthaler, 1987) :

$$C_a(\mu\text{g/mL}) = 11,24A_{661,6} - 2,04A_{644,8} \quad (2)$$

$$C_b(\mu\text{g/mL}) = 20,13A_{644,8} - 4,19A_{661,6} \quad (3)$$

$$C_{(x+c)}(\mu\text{g/mL}) = (1000A_{470} - 1,9C_a - 63,14C_b) / 214 \quad (4)$$

Où C_a est la chlorophylle a, C_b est la chlorophylle b et $C_{(x+c)}$ sont les caroténoïdes totaux.

2.4.2. Extraction des pigments hydrosolubles (les phycoérythrine)

L'extraction des phycoérythrine a été réalisée selon le protocole de Munier et al. (2014) avec quelques modifications. La biomasse microalgale a été remise en suspension dans du

tampon phosphate de sodium (20 mM, pH = 7,2) et les phycoérythrines ont été extraites par des cycles répétés de congélation/décongélation suivis d'un traitement par ultrasons. Le surnageant a été récupéré par centrifugation (10000g, 30 min, 4 °C) et la teneur en phycoérythrines a été calculée en utilisant les équations suivantes (Marcati et al., 2014) :

$$\text{B-PE (mg/mL)} = (A_{545\text{nm}} - 2,8[\text{R-PC}] - 1,34[\text{APC}])/12,7 \quad (5)$$

$$\text{R-PC (mg/mL)} = (A_{620\text{nm}} - 0,7A_{650\text{nm}})/7,38 \quad (6)$$

$$\text{APC (mg/mL)} = (A_{650\text{nm}} - 0,19A_{620\text{nm}})/5,65 \quad (7)$$

Avec R-PC est la phycocyanine, APC est l'allophycocyanine, B-PE est la B-phycoérythrine et A est l'absorbance.

2.5. Dosage de l'amidon

Un kit de dosage (Megazyme) a été utilisé pour quantifier l'amidon total présent chez *P. marinum* selon les recommandations du fournisseur. Cent milligrammes de la biomasse sèche sont mélangés avec 200 µL d'éthanol 80%, puis incubés avec 3 mL d'α-amylase thermostable (100 U/mL) à 100 °C pendant 6 min, en mélangeant périodiquement toutes les deux minutes pour gélatiniser et hydrolyser l'amidon en maltodextrines. Après refroidissement à 50 °C pendant 5 min, 0,1 mL d'amyloglucosidase (3300 U/mL), catalysant l'hydrolyse complète des maltodextrines en glucose, ont été ajoutés au mélange. Les échantillons sont à nouveau incubés pendant 30 minutes dans un bain-marie à 50 °C. Après incubation, le mélange est dilué (volume final 100 mL) puis clarifié par centrifugation à 3000 rpm pendant 10 min. Cent microlitres du surnageant est mélangé avec 3 mL du réactif GOPOD à la fois sensible et spécifique au glucose. Les tubes sont incubés à 50 °C pendant 20 min et une lecture d'absorbance à 510 nm est réalisée.

Cent microlitre d'une solution standard de glucose à 1 g/L additionnée de 3 mL du réactif de GOPOD ont servi comme contrôle positif pour cette réaction.

3. Dosages colorimétriques

3.1. Dosage des nitrates

Les nitrates constituent la source d'azote des microalgues dans le milieu de culture utilisé. Le suivi de leur concentration permet de prévoir la carence et donc l'entrée en phase stationnaire. La concentration en nitrates a été déterminée par la méthode de Cawse (1967) modifiée selon American Public Health Association (A.P.H.A. 1971), en ajoutant de l'acide perchlorique à 5% et en mesurant l'absorbance à 210 nm. Cependant, les interférences dues

aux protéines et à la présence de nitrites peuvent fausser les résultats. Pour cette raison, l'absorbance à 275 nm est mesurée et une formule correctrice est appliquée.

Quatre cent microlitres d'échantillons sont mélangés avec 3,6 mL d'acide perchlorique à 5%. L'absorbance est mesurée immédiatement après mélange à 210 et 275 nm. En parallèle, une gamme étalon de nitrate de sodium est réalisée entre 0 et 0,1 g/L à partir d'une solution mère de nitrate de sodium (NaNO₃) à 0,5 g/L.

La teneur en nitrate est déterminée selon l'équation décrite ci-dessous :

$$A_{\text{corrigée}} = A_{210} - 2(A_{275} - A_{\text{moy}275/\text{gamme}}) \quad (8)$$

Avec A_{210} : absorbance de l'échantillon à 210 nm

A_{275} : absorbance de l'échantillon à 275 nm

$A_{\text{moy}275/\text{gamme}}$: absorbance moyenne de la gamme étalon à 275 nm

Les absorbances corrigées obtenues sont reportées sur la gamme étalon et permettent de déterminer la concentration en nitrate de la solution analysée.

3.2. Dosage d'acétate

Afin de suivre la consommation d'acétate par *P. marinum*, des prélèvements périodiques à partir de la culture microalgale ont été réalisés et analysés par HPLC (High Performance Liquid Chromatography). La chaîne utilisée est constituée de deux colonnes d'exclusion ionique montées en série (Rezex ROA 300 x 7,8mm, Phenomenex, USA) et placées dans un four thermostaté à 50 °C. L'éluant est une solution à 2 mM d'acide sulfurique dont le débit est fixé à 0,7 mL/min. L'appareil est muni d'un injecteur automatique. La détection des divers composés est assurée par un réfractomètre. L'acquisition et l'intégration sont réalisées grâce à un logiciel (HP Chem, Agilent Technologies). La méthode est étalonnée par injection de différentes concentrations en acétate (entre 0,1 et 10 g/L) afin d'établir une gamme étalon.

Préalablement à l'injection, les échantillons sont déprotéinisés en mélangeant 400 µL avec 50 µL de baryte et 50 µL de ZnSO₄. Le mélange est centrifugé pendant 5 min à une vitesse de 10000g. Le surnageant récupéré est filtré sur filtre nylon millipore 0,2 µm et placé dans un vial à HPLC.

3.3. Dosage des oses totaux

Les teneurs en oses totaux ont été déterminées selon la méthode de Dubois et al. (1956). Ce dosage permet d'hydrolyser les liaisons glycosidiques en présence d'acide sulfurique

concentré. La cyclisation de ces unités osidiques aboutit à la formation de composés furfuriques. Ces derniers interagissent avec les composés phénoliques par condensation pour former des composés de coloration jaune-orange qui absorbent à 485 nm. Dans des tubes à verre, 500 μ L d'échantillon sont mélangés avec 500 μ L d'une solution de phénol à 5%. Après homogénéisation, 2,5 mL d'acide sulfurique (H_2SO_4 , 96%) sont ajoutés. Les tubes sont ensuite incubés à l'obscurité pendant 30 min et l'absorbance est mesurée à 485 nm.

Une gamme étalon de glucose est réalisée avec des concentrations en oses comprises entre 0 et 0,1 g/L.

3.4. Dosages des oses neutres et acides

3.4.1. Dosages des oses neutres

Deux cents microlitres d'échantillon sont mélangés avec 200 μ L d'une solution de résorcinol à 6 g/L et 1 mL d'acide sulfurique à 80%. Après agitation, les tubes sont placés au bain marie à 90 °C pendant 30 min, puis à température ambiante pendant 30 min à l'abri de la lumière. Au cours de cette réaction, les liaisons glycosidiques sont hydrolysées sous l'action de l'acide sulfurique. Leur déshydratation conduit à la formation des composés furfuriques qui réagissent par condensation avec le résorcinol (composé phénolique) pour former des composés absorbant à 450_{nm}. Chaque tube est par la suite dilué en ajoutant 1,4 mL d'eau ultra-pure et l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde égale à 450_{nm}.

La concentration en oses neutres est obtenue à partir d'une gamme étalon de glucose réalisée à des concentrations comprises entre 0 et 0,3 g/L. Une gamme d'acide glucuronique est également réalisée aux mêmes concentrations pour prendre en considération les interférences liées aux acides uroniques.

3.4.2. Dosage des oses acides

Une solution de borax ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$) à 0,12 M est préparée en solubilisant 22,88 g de borax dans 500 mL d'acide sulfurique 96 % (m/v) pendant 16 h à 4°C et à l'abri de la lumière. Une deuxième solution de méta-hydroxybiphényle (m-HBP) est préparée en solubilisant 100 mg de m-HBP dans 1 mL de DMSO. La solution est stockée à 4°C à l'abri de la lumière. Juste avant utilisation 102 μ L de la solution m-HBP sont dilués dans 5 mL d'acide sulfurique 80% (m/v). Pour doser les oses acides, 200 μ L d'échantillon sont mélangés avec 1 mL de Borax. Après une heure d'incubation à 90 °C, 200 μ L de la solution m-HBP/acide sulfurique sont ajoutés au mélange réactionnel et une incubation de 2 min à 90 °C est réalisée. Par

conséquent, les acides uroniques présents réagissent avec le m-HBP pour former un chromophore de couleur rose absorbant à 520_{nm}. La concentration en oses acides est déterminée à partir d'une gamme de référence d'acide glucuronique réalisée à des concentrations allant de 0 à 0,3 g/L.

3.4.3. Corrections des interférences

Il existe des interférences entre les oses acides (OA) et les oses neutres (ON) qui entraînent des erreurs de quantification. Une formule correctrice est appliquée suivant la méthode de Montreuil et Spik (1963) en se basant sur les deux gammes étalon de glucose et d'acide glucuronique.

En effet les concentrations en oses neutres et oses acides ont été déterminées selon les équations suivantes ((9) et (10)) :

$$A_{\text{résorcinol}} = \alpha [\text{ON}] + \beta [\text{OA}]$$

$$A_{\text{m-HBP}} = \beta' [\text{OA}]$$

$$[\text{ON}] = [A_{\text{résorcinol}} - (\beta (A_{\text{m-HBP}} / \beta'))] / \alpha \quad (9)$$

$$[\text{OA}] = A_{\text{m-HBP}} / \beta' \quad (10)$$

Avec:

α : est le coefficient directeur de la gamme étalon d'ON obtenue par le dosage au résorcinol,

β : coefficient directeur de la gamme étalon d'OA obtenue par le dosage au résorcinol,

β' : coefficient directeur de la gamme étalon d'OA obtenue par le dosage au m-HBP,

3.5. Dosage des protéines solubles selon la méthode de Lowry et al. (1951)

Trois solutions ont été préparées séparément puis mélangées avant utilisation avec un ratio 100 : 1 : 1 (A : B : C) pour former la solution de Lowry.

Solution A:

NaOH	2,8598 g
Na ₂ CO ₃	14,3084 g
Eau ultra-pure qsp	500 mL

Solution B:

CuSO ₄ , 5 H ₂ O	1,4232 g
Eau ultra-pure	100 mL

Solution C:

NO ₂ Tartrate, 2 H ₂ O	2,8598 g
Eau ultra-pure	100 mL

Cinq cents microlitres d'échantillon sont mélangés avec 700 µL de réactif de Lowry puis incubés 20 min à température ambiante. Après incubation, 100 µL de réactif de Folin-Ciocalteu sont ajoutés au mélange réactionnel aboutissant à la réduction des acides aminés aromatiques (tyrosine et tryptophane) et à la formation d'un complexe coloré bleu foncé dont on peut mesurer l'absorbance à 750_{nm}. La quantité de protéines est déterminée en se basant sur une courbe d'étalonnage préparée dans les mêmes conditions en utilisant l'Albumine de Sérum Bovin (SAB).

3.6. Dosage des sulfates

Le degré de sulfatation des polysaccharides a été déterminé par la méthode turbidimétrique au BaCl₂/gélatine (Dodgson et Price, 1962). Cent cinquante milligrammes de gélatine sont dissous dans 50 mL d'eau ultra pure à 70°C. Après refroidissement 16 h à 4 °C, la solution de gélatine est additionnée de 0,5 g de BaCl₂, 2H₂O.

Cent vingt milligrammes d'échantillon à analyser sont hydrolysés avec 3 mL d'acide chlorhydrique 2M pendant 2h à 100°C. L'hydrolysate est centrifugé à 13000 g pendant 30 min à 20°C. Un millilitre de surnageant est mélangé avec 9 mL d'eau ultra pure, 1 mL HCl à 0,5 M et 0,5 mL de réactif BaCl₂/gélatine. Les ions sulfates libérés lors de l'hydrolyse vont former, en présence de chlorure de baryum et de gélatine, un précipité de sulfate de baryum. Après une incubation de 30 min à température ambiante, le mélange est vortexé et l'absorbance est lue à 550_{nm}. Une gamme étalon de sulfate de potassium (K₂SO₄) de 0,5 à 3 mg/mL est réalisée à l'aide d'une solution mère à 3 mg/mL.

4. Caractérisation structurale et physico-chimique des métabolites**4.1. Analyse de la fraction lipidique**

La composition en acides gras de la fraction lipidique extraite à partir de *P. marinum* a été déterminée par le biais de la chromatographie en phase gazeuse (CPG). Les lipides doivent être préalablement estérifiés pour pouvoir mener cette réaction. Pour ce faire, 50 µL d'échantillon lipidique dissous dans 1 mL de chloroforme sont mélangés avec 400 µL de méthanol/boron trifluoride (MeOH/BF₃) à 10%. Après incubation 15 min à 100 °C, 750 µL d'eau distillée et 375 µL d'un mélange de solvant (hexane/heptadecane (solvant interne),

100 : 1 v/v) sont ajoutés au milieu réactionnel. Après 2 min d'homogénéisation et décantation, la phase organique est récupérée dans un vial afin d'être injecté en CPG.

L'appareil utilisé est une chromatographie en phase gazeuse (Agilent technologies, 6850) munie d'une colonne Agilent technologies HP88 (100m x 0,25 mm x 0,20 μ m) et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). Le gaz vecteur est l'azote. Les températures de l'injecteur et du détecteur sont fixées à 260 °C. Le split ratio est de 1:20 (v/v). Les paramètres de la méthode sont : une température initiale de 140 °C pendant 5 min puis une augmentation de 4 °C/min jusqu'à 240 °C. Cette température est maintenue jusqu'à la fin de cette méthode qui dure 35 min. L'identification des acides gras estérifiés a été réalisée par comparaison des temps de rétention obtenus avec ceux des standards connus.

4.2.Composition en monosaccharides des polysaccharides

L'identification et la quantification des monosaccharides constitutifs de l'EPS de *P. marinum* a été menée par chromatographie échangeuse d'anions à haute performance (CEAHP). Cette chromatographie est de type ICS 3000 (Dionex). Elle est composée d'un injecteur automatique AS40, d'un module de pompe pouvant fonctionner en gradient et d'un détecteur à ampérométrie pulsée (CEAHP-DAP). L'acquisition et le traitement des données sont réalisés par le logiciel Chromeleon.

Après une hydrolyse acide au TFA (Acide trifluoroacétique) 2 M à 120 °C pendant 1h30, l'exopolysaccharide hydrolysé est neutralisé avec de l'ammoniaque à 35% puis centrifugé à 14000 g pendant 15 min. Le surnageant récupéré est filtré à 0,22 μ m avant injection. L'élution est réalisée dans une pré-colonne et une colonne CarboPac PA1 (4 x 50 mm et 4 x 250 mm respectivement) dont la phase stationnaire est une résine échangeuse d'anions qui va permettre de séparer les molécules anioniques. Cette phase est constituée de billes de polystyrène et de divinylbenzène de 10 μ m de diamètre, sur lesquelles sont agglomérées des particules fonctionnalisées par des groupements ammonium quaternaire (NR₄⁺). Ce type de phase stationnaire peut supporter des pressions de 4 000 psi (275 bars) dans une large gamme de pH (de 0 à 14).

Les hydrolysats polysaccharidiques sont élués à l'aide d'une phase mobile constituée d'hydroxyde de sodium à 18 mM et d'un gradient d'acétate de sodium. Ils sont alors transformés en alcoolates à des pH supérieurs au pKa de leurs fonctions hydroxyles (-OH → -O⁻). Avant injection, les colonnes sont équilibrées pendant 15 min avec l'hydroxyde de sodium 18 mM puis les échantillons sont élués de façon isocratique pendant 30 min avec du NaOH 18 mM, suivi d'un gradient linéaire variant de 0 à 0,5M d'acétate de sodium dans du

NaOH 200 mM pendant 20 min pour finir par 100% d'acétate de sodium 1M dans du NaOH 200 mM pendant 20 min. Finalement, le système est rééquilibré pendant 15 min avec du NaOH 18 mM après avoir passé de la soude à 200 mM (**Tableau 3**).

Tableau 3: Gradient utilisé en CEAHP pour l'analyse des monosaccharides

Temps (min)	Hydroxyde de sodium (NaOH) 200 mM	Acétate de sodium (CH ₃ COONa) 1M Hydroxyde de sodium (NaOH) 200 mM	Hydroxyde de sodium (NaOH) mM	de 18	Eau ultra pure
-5	0	0	100%		0
30	0	0	100%		0
30	30%	10%	0		60%
50	50%	50%	0		0
51	0	100%	0		0
70	0	100%	0		0
71	100	0	0		0
85	100	0	0		0
86	0	0	100%		0
92	0	0	100%		0

Lorsque les monomères sont élués de la colonne, ils sont oxydés à la surface d'une électrode en or. L'oxydation génère un courant électrique proportionnel à la concentration en analytes ce qui rend l'analyse quantitative. Le potentiel appliqué à l'électrode, génère des produits d'oxydation qui abîment sa surface. Afin de prévenir la diminution du signal, la surface de l'électrode est nettoyée par l'application d'une série de potentiels pendant des périodes fixées après le potentiel de détection (ampèrométrie pulsée).

Une gamme d'étalons externes puis l'ajout d'un étalon interne dans l'échantillon à analyser permet d'estimer qualitativement et quantitativement la composition en monosaccharides des hydrolysats de polysaccharides.

4.3. Analyse infrarouge (IRTF)

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) est une méthode permettant d'identifier les liaisons ainsi que les groupements fonctionnels d'un échantillon. Dans ce contexte, des mesures infrarouges ont été effectuées à l'aide d'un spectromètre VERTEX 70 (Bruker). Les échantillons ont été analysés sur un module ATR A225 diamant. Les spectres IR (50 scans) ont été obtenus à température ambiante (référéncés contre l'air) sur la plage 500-4000 cm⁻¹. Les spectres ont été analysés avec le logiciel OPUS 7.2.

4.4. Chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de la lumière laser multi-angles (CES-DLLMA)

L'étude en régime dilué des propriétés physico-chimiques des polymères et notamment la détermination de leur masse molaire peut être réalisée en chromatographie d'exclusion stérique (ou gel perméation) couplée à un détecteur de diffusion de la lumière multiangles (CES-DLLMA ou SEC-MALLS : Size Exclusion Chromatography – « Multi-Angle Laser Light Scattering ») et d'un réfractomètre différentiel. La chromatographie permet la séparation des molécules en fonction de leur taille. En sortie de colonne un réfractomètre quantifie la quantité de polymère et un détecteur à diffusion de la lumière à angles multiples détermine la masse molaire des macromolécules.

Les polysaccharides sont mis en solution dans l'éluant de chromatographie : une solution de nitrate de lithium (LiNO_3) à 0,1 M. Le système chromatographique utilisé comprend un injecteur automatique d'échantillons (SIL 20A, Shimadzu), équipé d'une boucle d'injection de 100 μL . Le solvant est entraîné par une pompe (LC 10Ai, Shimadzu) à un débit de 0,5 mL/min vers deux filtres disposés en série : 0,45 μm et 0,1 μm . Un dégazeur en ligne (DGU 20A3prominence, Shimadzu) est placé avant la pompe. Le produit est d'abord entraîné dans une pré-colonne (Shodex OHPAK SB-G) avant d'être dirigé vers deux colonnes d'exclusion stérique disposées en série (Shodex OHPAK SB 804 et 806 HQ). A la sortie de la colonne, les composés sont quantifiés par un réfractomètre différentiel (RID 10A, Shimadzu) puis un détecteur à diffusion de lumière multiangle (Dawn® heleos, Wyatt technology) équipé d'une cellule K5 de 50 μL , d'une source rouge (Ga-As 690nm) de 5 mW, et de 18 diodes de mesures (angles répartis autour de la cellule), et couplé à un détecteur de viscosité (Viscostar 2, Wyatt Technology). Les données obtenues sont traitées avec le logiciel Astra 6.1.1.

Le logiciel Astra donne les variations de l'intensité de la lumière diffusée au niveau de chaque photorécepteur. La relation générale de la diffusion de la lumière est donnée par l'équation de Zimm (1948) (Equation 11).

$$\frac{K_C}{\Delta R_\theta} = \frac{1}{M_w} + \frac{16\pi^2 n_0^2}{3\lambda_0^2} \times \frac{R_g^2}{M_w} \times \sin^2 \frac{\theta}{2} + 2A_2c + C^2 \quad (11)$$

$$\text{Où } K = \frac{2\pi^2 n_0}{\lambda_0^4 N_a} \left[\frac{dn}{dc} \right]^2 \quad (12)$$

Avec :

ΔR_θ : Rapport de Rayleigh

C : Concentration en polymère (g/mL)

M_w : Masse molaire moyenne en masse du polymère

R_g : Rayon de giration (nm)

n_0 : Indice de réfraction du solvant

λ_0 : Longueur d'onde du faisceau incident (nm)

N_a : Nombre d'Avogadro

θ : Angle d'observation par rapport à la lumière incidente

A_2 : Second coefficient du viriel

La masse molaire M_w et le rayon de giration s'obtiennent également par le diagramme de Zimm [$Kc/\Delta R_\theta$] = f(sin²($\theta/2$)) avec $1/M_w$ comme ordonnée à l'origine.

Les masses molaires moyennes en nombre (M_n) et les masses molaires moyennes en masse (M_w) sont obtenues par chromatographie. Le M_n est la masse totale des molécules d'un échantillon divisée par la quantité de molécules contenues dans l'échantillon. Le M_w est la masse molaire moyenne en masse. Elle prend en compte la place que les molécules prennent en rapport avec leur taille. C'est-à-dire qu'elle prend en considération le fait que les molécules plus petites occupent moins de masse que les grosses molécules sur la masse totale de l'échantillon (Equation 13).

$$\overline{M}_n = \frac{\sum n_x M_x}{\sum n_x} \quad \overline{M}_w = \frac{\sum n_x M_x^2}{\sum n_x M_x} \quad (13)$$

X : Degré de polymérisation

n_x : Nombre de macromolécules de degré de polymérisation x

M_x : Masse molaire des macromolécules

Les échantillons sous forme lyophilisée ont été préparés à 0,5 g/L dans du LiNO₃ 0,1 M, chauffés à 60 °C sous agitation douce magnétique pendant 4 h puis filtré à 0,45 microns. Le dn/dC utilisé est de 0,150 mL/g

4.5. Etude rhéologique

La rhéologie est l'étude de l'écoulement ou de la déformation des produits sous l'effet d'une contrainte appliquée. La force appliquée par unité de surface d'un fluide définit la contrainte de cisaillement τ (Pa ou N/m²) calculée selon l'équation suivante :

$$\tau = F/S = \eta dv/dz = \eta\gamma \quad (14)$$

Avec :

γ : Taux de cisaillement ou vitesse de cisaillement (shear rate) en 1/s

η : Viscosité dynamique en Pa.s

F : Force de frottement qui s'exerce à la surface de séparation de deux couches qui s'opposent au glissement d'une couche sur l'autre en N

S (ou H) : Surfaces en contact avec le liquide (m²)

dv : Différence de vitesse entre les deux couches en m/s

dz : Distance séparant les deux couches de fluides contiguës en m

La viscosité apparente d'un liquide varie avec le taux de cisaillement auquel il est soumis. La manière dont la viscosité apparente change va permettre de définir le comportement rhéologique du liquide. En effet on distingue des fluides newtoniens dont la viscosité est constante quel que soit l'intensité du cisaillement, des fluides plastiques ou fluides à seuil qui ne s'écoulent qu'à partir d'une contrainte seuil, les fluides pseudoplastiques ou rhéofluidifiants qui présentent une diminution de la viscosité avec l'augmentation du taux de cisaillement et finalement les fluides rhéoépaississants dont la viscosité augmente avec l'augmentation de taux de cisaillement.

Dans ce travail, les mesures de viscosités ont été effectuées à l'aide d'un rhéomètre AR-G2 (TA Instrument, Grande-Bretagne, Ltd) en système rotatif avec une géométrie cône/plan de 400 mm et à une température de 30 °C. L'entrefer (gap) du système était de 5 mm et les mesures de viscosité ont été réalisées sur une gamme de cisaillement allant de 1 à 10³ 1/s.

5. Obtention de polysaccharides de différents poids moléculaires

Les polysaccharides de *P. marinum* ont été traités à l'aide d'un homogénéisateur à haute pression (HHP) (2,7 kbars) pour l'obtention de fractions polysaccharidiques de poids moléculaires différents. Une solution mère de polysaccharide a été préparée à une concentration de 2 g/L. Cette solution a été passée deux fois dans le HHP. Une portion du

broyat obtenu a été récupérée alors que le reste a été passé encore trois fois dans l'homogénéisateur. Les composés dégradés ont été par la suite récupérés et lyophilisés.

Les échantillons dégradés sont étiquetés comme suit :

- EPS-0P pour l'échantillon non dégradé,
- EPS-2P pour le polysaccharide après deux passages à l'homogénéisateur à haute pression,
- EPS-5P pour le polysaccharide après cinq passages.

6. Optimisation de la production de B-phycoérythrine (B-PE)

Pour l'optimisation de la production de B-PE, une culture stock de *P. marinum* a servi d'inoculum (10%, v/v) pour toutes les expériences. La souche a été cultivée dans le milieu « Pm » précédemment décrit et a été maintenue sous une intensité lumineuse de 150 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$, à 20 °C et sous une agitation continue de 110 rpm.

6.1. Criblage des facteurs influençant la production de B-PE

La conception du plan de criblage Plackett-Burman a été adoptée afin de déterminer les facteurs significatifs influant sur la production de B-PE à partir de *P. marinum*. Huit variables ont été choisies et testées à leurs niveaux (+1) (élevés) et (-1) (faibles) à savoir : NaCl (X_1), NaNO₃ (X_2), MgSO₄ (X_3), CaCl₂ (X_4), K₂HPO₄ (X_5) (exprimés en g/L), intensité lumineuse (X_6) ($\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$), solution métallique (X_7) (mL/L) et solution vitaminique (X_8) (ml/L) (**Tableau 4**).

Tableau 4: Domaine expérimental du plan Plackett-Burman et niveaux des variables indépendantes

Plan Plackett-Burman				
Facteurs codés	Variables	Unités	Niveau (-1)	Niveau (+1)
X1	NaCl	g/L	18 (-1)	38 (+1)
X2	NaNO ₃	g/L	0 (-1)	3,4 (+1)
X3	MgSO ₄	g/L	4 (-1)	10,4 (+1)
X4	CaCl ₂	g/L	1 (-1)	2 (+1)
X5	K ₂ HPO ₄	g/L	0 (-1)	1,8 (+1)
X6	Intensité lumineuse	$\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$	70 (-1)	230 (+1)
X7	Solution métallique	mL/L	0,5 (-1)	1,5 (+1)
X8	Solution vitaminique	mL/L	0,5 (-1)	1,5 (+1)

Douze modèles expérimentaux ont été fixés selon la matrice d'Hadamard. Ainsi des erlenmeyers de 250 mL ont été inoculés avec 100 mL de milieu de culture et incubés sur un agitateur rotatif à 20 °C. Les cultures ont été récoltées après 30 jours de croissance. Toutes les expériences ont été faites en double et la production de B-phycoérythrine a été prise comme réponse. Les résultats expérimentaux sont traités avec un niveau de confiance de 95% et analysés à l'aide du logiciel MODDE version 11.

6.2.Optimisation de la production de B-phycoérythrine à l'aide de la méthode de surface de réponse (RSM)

Les facteurs sélectionnés à partir du plan Plackett-Burman ont été optimisés *via* le modèle Box-Behnken et selon la méthodologie de surface de réponse. En effet, pour chacun des quatre facteurs les plus influents choisis : concentration en NaNO₃ (A), concentration en K₂HPO₄ (B), intensité lumineuse (C) et solution métallique (D), trois niveaux (-1: faible, 0: moyen, +1 : élevé) ont été attribués (**Tableau 5**).

Tableau 5 : Domaine expérimental du plan Box-Behnken et niveaux des variables indépendantes

Plan Box-Behnken					
Facteurs codés	Variables	Unités	Niveau (-1)	Niveau (0)	Niveau (+1)
A	NaNO ₃	g/L	0 (-1)	1,7 (0)	3,4 (+1)
B	K ₂ HPO ₄	g/L	0 (-1)	0,9 (0)	1,8 (+1)
C	Intensité lumineuse	μmol photons/m ² /s	70 (-1)	150 (0)	230 (+1)
D	Solution métallique	mL/L	0,5 (-1)	1 (0)	1,5 (+1)

Par conséquent, l'objectif de ce plan a été d'étudier l'effet de ces facteurs sur la production de B-phycoérythrine par *P. marinum* ainsi que les interactions établies entre les facteurs afin de déterminer les conditions optimales de production. En effet, vingt-sept expériences avec trois expériences au centre (pour estimer l'erreur expérimentale) ont été établies. La production de B-phycoérythrine (Y) a été représentée par une équation polynomiale (15) du second degré avec des effets linéaires, quadratiques et d'interaction en utilisant la méthode des moindres carrés.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (15)$$

Où Y est la réponse prédite exprimée en mg/g MS, β_0 est une constante, β_i est le coefficient linéaire, β_{ii} représente le coefficient quadratique, β_{ij} le code de l'interaction et X_i , X_j les variables indépendantes. Les résultats sont traités par la version 11 du logiciel MODDE.

7. Purification de B-phycoérythrine

La purification de la B-phycoérythrine a été réalisée selon Sonani et al. 2014 avec quelques modifications. L'extrait brut (protocole d'extraction voir section 2.4.2 du chapitre matériels et méthodes) a été soumis à deux étapes de précipitations au sulfate d'ammonium. La première est à 20% de saturation puis le surnageant rouge obtenu après centrifugation (17000 g, 20 min, 4 °C) du premier mélange est précipité à 40% de sulfate d'ammonium. La solution de précipitation des deux étapes est laissée au repos pendant 1 heure à 4 °C. Le culot rouge obtenu après centrifugation (17000 g, 20 min, 4 °C) du deuxième mélange est remis en suspension dans un volume minimum de tampon phosphate de sodium (20 mM, pH = 7,2) et dialysé, contre le même tampon à 4 °C, sur une membrane de cellulose régénérée (RC) de 10 kDa MWCO. Les protéines obtenues après le dessalage sont injectées sur une colonne échangeuse d'anions DEAE-Cellulose pré-équilibrée avec du tampon phosphate de sodium (20 mM, pH = 7,2). Après lavage, la colonne est éluée avec un tampon d'éluion contenant un gradient croissant de NaCl de 0 à 0,5 M à un débit de 1 mL/min. L'éluat est collecté sous forme de fractions de 1 mL. Les fractions de couleur rose sont regroupées et analysées. En effet, la teneur en protéines et la pureté de la B-phycoérythrine à chaque étape de purification ont été mesurées par la méthode de Lowry et al. (1951) et par le calcul du rapport A_{545}/A_{280} , respectivement.

Une électrophorèse SDS-PAGE est réalisée en utilisant un gel de polyacrylamide Tris-glycine à 12% avec un marqueur de poids moléculaire compris entre 11 kDa et 245 kDa (Laemmli, 1970).

8. Test des activités biologiques et antioxydantes

Les différents tests décrits ci-dessus ont été menés en triplicata.

8.1. Test des activités biologiques

8.1.1. Activité antibactérienne

8.1.1.1. Méthode de diffusion sur puits

La mise en évidence de l'activité antibactérienne a été réalisée en utilisant la méthode de diffusion sur puits. Pour ce faire, 4 souches bactériennes ont été utilisées, à savoir: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus* résistante à la méticilline (SMR), *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Salmonella* Enteridis ATCC 13076. Sur des boîtes de Pétri contenant le milieu LB solide (composition décrite dans l'annexe 1) préalablement ensemencé avec l'inoculum bactérien, des puits de 6 mm ont été creusés dans le milieu puis scellés avec une fine couche de gélose molle liquéfiée afin de limiter la diffusion de l'échantillon sous la gélose. Les échantillons à tester ont été placés à raison de 50 µl dans chaque puits. L'eau distillée stérile est utilisée comme contrôle négatif. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés après 18 heures d'incubation à 30 °C.

8.1.1.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée en utilisant la méthode de microdilution sur des plaques à 96 puits stériles. Les quatre souches bactériennes ont été cultivées dans un milieu LB (composition décrite dans l'annexe 1) à 30 °C. Environ 10⁵ UFC/ml de chaque suspension bactérienne ont été incubées pendant 24 h à 30 °C en présence de l'échantillon à tester à des concentrations allant de 7,81 à 1000 µg/ml. Les puits contenant la souche bactérienne seule ont été utilisés comme contrôle positif, tandis que les puits contenant uniquement le milieu de culture ont été considérés comme contrôle négatif. Les valeurs de la CMI ont été déterminées comme la concentration la plus faible de l'extrait montrant une inhibition complète de la croissance des cellules bactériennes.

8.1.2. Activité anti-*Candida albicans*

La mise en évidence de l'activité antifongique contre *Candida albicans* 10231 a été réalisée en utilisant la méthode de microdilution sur une plaque à 96 puits. 10⁵ UFC/mL de *C. albicans*, préalablement cultivées à 30 °C dans un milieu WB dont la composition est décrite dans l'annexe 1, ont été incubées pendant 24 h à 37 °C en présence de l'échantillon en question avec une concentration finale allant de 7,81 à 1000 µg/ml.

Deux contrôles ont été préparés pour ce test à savoir : la souche *Candida albicans* dans le milieu WB comme contrôle positif et un contrôle négatif incluant seulement le milieu de

culture. Les valeurs de CMI ont été déterminées comme la concentration la plus faible de l'extrait montrant une inhibition totale de la croissance des cellules de *Candida*.

8.1.3. Inhibition de la formation du biofilm *Candida albicans*

La quantification du biofilm de *Candida albicans* a été réalisée en utilisant le test de coloration au cristal violet sur une plaque de polystyrène à 96 puits. En effet, une suspension de *Candida albicans* de concentration finale de 10^5 UFC/ml a été préparée dans le milieu de culture RPMI 1640 (R8758, Sigma-Aldrich). Cinquante microlitres d'inoculum de *C. albicans* ont été distribués dans chaque puits de la microplaque en présence des différentes concentrations d'échantillon allant de 7,81 à 1000 $\mu\text{g/mL}$ pour avoir un volume final de 100 μL . La plaque a ensuite été incubée à 37 °C pendant 24 h. Après incubation, une coloration au cristal violet a été réalisée afin de mettre en évidence l'effet inhibiteur de la formation du biofilm. En bref, le milieu de culture a été retiré et chaque puits a été lavé deux fois avec du tampon PBS (pH = 7,4 ; 0,1 M). Cent microlitres de méthanol à 99% ont été ajoutés pour fixer le biofilm formé qui a ensuite été coloré avec du cristal violet à 0,05% pendant 15 minutes à température ambiante. L'excès de colorant a été éliminé par deux lavages avec de l'eau ultra pure. Une coloration violette est apparue après l'addition de 100 μL d'acide acétique à 33% et a été détectée à 630 nm. Le pourcentage d'inhibition de la formation de biofilm est déterminé par l'équation ci-dessous :

$$\% \text{ d'inhibition} = [100 - ((A_{\text{échantillon}} - A_{\text{blanc}})/(A_{\text{témoin positif}} - A_{\text{blanc}}))] \times 100 \quad (16)$$

Avec A_{Blanc} et $A_{\text{Témoin positif}}$ correspondent à l'absorbance du milieu RPMI et du biofilm non traité à 630 nm respectivement.

8.1.4. Activité anticancéreuse

L'activité anticancéreuse a été déterminée par le test XTT qui repose sur la propriété des cellules à réduire le sel de tetrazolium (XTT) en un dérivé du formazan de couleur orange sous l'action des enzymes mitochondriales. De ce fait, plus il y a de cellules vivantes, plus il y aura de formazan et plus le milieu sera coloré.

Des cellules du carcinome mammaire murin 4T1 sont ensemencées dans des plaques à 96 puits à des concentrations égales à 10^4 cellules/puits. Le milieu de culture RPMI 1640 est par la suite retiré et remplacé par l'échantillon à des concentrations allant de 62,5 à 2000 $\mu\text{g/mL}$ préparé dans le milieu RPMI. Après 24 h d'incubation, la viabilité cellulaire est évaluée par le test XTT. En effet, l'extrait est éliminé et la plaque est rincée deux fois avec du PBS (D8537,

Sigma-Aldrich). Cent microlitres du mélange XTT sont ajoutés dans chaque puit suivi d'une incubation pendant 3h à température ambiante, à l'obscurité et en présence de CO₂ (5%). Après incubation, 90 µL du mélange réactionnel sont transférés dans une nouvelle plaque à 96 puits et une lecture de l'absorbance à 450 nm est réalisée en utilisant un lecteur de microplaques multilabel (VICTOR 3V Perkin Elmer).

Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité via la formule suivante :

$$\% \text{ Viabilité} = (A_{\text{essai}} / A_{\text{Témoin}}) \times 100 \quad (17)$$

A_{Témoin} : Absorbance des cellules non traitées à 450 nm

8.2. Test des activités anti-oxydantes

8.2.1. Activité de piégeage du DPPH

Le piégeage du radical libre 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyle DPPH a été évalué selon Karkouch et al. 2017, avec quelques modifications. Cent microlitres d'une solution de DPPH (0,06 mM dans de l'éthanol) sont mélangés avec 100 µL d'échantillon à diverses concentrations. La solution est maintenue pendant 30 min dans l'obscurité à température ambiante avant de mesurer son absorbance à 517 nm. Les activités de piégeage du DPPH sont évaluées en tant que pourcentage d'inhibition du DPPH en utilisant l'équation suivante :

$$(\%) \text{ Inhibition} = ((A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{blanc}}) \times 100 \quad (18)$$

L'acide L-ascorbique a été utilisé comme témoin positif à des concentrations allant de 0 à 100 µg/mL. A_{blanc} et A_{échantillon} sont les absorbances à 517 nm de la solution de DPPH avant et après l'addition de l'extrait ou de l'acide L-ascorbique, respectivement.

8.2.2. Pouvoir réducteur

La capacité de l'extrait à réduire le fer ferrique (Fe³⁺) en fer ferreux Fe²⁺ a été évaluée par la méthode décrite par Pownall et al. (2011). Cinquante microlitres d'échantillon à différentes concentrations sont mélangés avec 50 µL de tampon phosphate 0,2 M (pH = 6,6) et 50 µL de ferricyanure de potassium à 1% (m/v). Le mélange est incubé à 50 °C pendant 20 minutes. Après refroidissement, la réaction est arrêtée en ajoutant de l'acide trichloroacétique à 10% (m/v) et ensuite centrifugée à 15000 g pendant 10 min. Deux cents microlitres du surnageant sont mélangés avec 200 µL d'eau distillée et 40 µL de chlorure ferrique à 0,1%. L'absorbance à 700 nm est mesurée après une incubation à température ambiante dans l'obscurité pendant 10 min. L'acide L-ascorbique a été utilisé comme contrôle positif à

desconcentrations allant de 0 à 100 µg/mL. Une augmentation continue de l'absorbance à 700 nm témoigne un pouvoir réducteur important.

8.2.3. Pouvoir chélateur de fer

Le pouvoir chélateur de fer a été déterminé selon la méthode de Yarnpakdee et al. (2015) avec quelques modifications. Trois cents microlitres d'échantillon sont mélangés avec 25 µL de FeCl₂, 4 H₂O (2 mM) et 50 µL de ferrozine (5 mM). Ensuite, le mélange est incubé pendant 10 min à température ambiante avant une lecture d'absorbance à 562 nm.

L'éthylène diamine tétraacétate (EDTA) a été utilisé comme contrôle positif pour des concentrations de 0 jusqu'à 100 µg/mL et le pourcentage d'inhibition de la formation du complexe ferrozine-Fe²⁺ a été évalué selon l'Equation (19).

$$\text{Effet chélateur (\%)} = [(A_{\text{blanc}} - A_{\text{extrait}}) / A_{\text{blanc}}] \times 100 \quad (19)$$

A_{blanc} est l'absorbance du milieu réactionnel sans l'extrait à 562 nm.

8.2.4. Activité inhibitrice de l'oxydation du β-carotène

Ce test est basé sur la perte de la couleur jaune du β-carotène due à sa réaction avec les radicaux formés lors de l'oxydation de l'acide linoléique. Par conséquent, le degré de blanchiment du β-carotène peut être atténué en présence d'un antioxydant.

Deux milligrammes de β-carotène sont dissous dans 20 mL de chloroforme. Quatre millilitres de cette solution sont mélangés avec 40 mg d'acide linoléique et 400 mg de Tween 40. Après évaporation du chloroforme, 70 mL d'eau distillée saturée en oxygène sont ajoutés et l'émulsion formée (acide β-carotène-linoléique) a été vigoureusement agitée. Trois cents microlitres de l'émulsion sont ajoutés à 25 µL de l'échantillon à analyser puis incubés à 50 °C dans un bain d'eau pendant 120 min (Kesraoui et al., 2011). Le pourcentage d'inhibition du blanchiment du β-carotène est évalué selon la formule suivante :

$$\text{(\%)} \text{ Inhibition} = (A1 / A2) \times 100 \quad (20)$$

Avec A1 l'absorbance au temps zéro à 470 nm, A2 l'absorbance à 470 nm après 120 minutes d'incubation.

L'hydroxytoluène butyle (BHT) est utilisé comme témoin positif à des concentrations allant de 0 à 100 µg/mL.

Résultats et discussion

Chapitre 3:

*Optimisation de la production de B-phycoérythrine par la microalgue rouge *Porphyridium marinum* et test de ses activités antioxydantes*

PLAN

Introduction

1. Criblage des facteurs via le plan Plackett-Burman
2. Optimisation de la production de B-PE moyennant le plan Box-Behnken
3. Fractionnement et purification de B-PE
4. Evaluation de l'activité antioxydante
5. Relation composition en acides aminés et activités antioxydantes

Conclusion

Introduction

Ces dernières années, l'extraction de biomolécules à pouvoir antioxydant a reçu beaucoup d'attention dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et dans le domaine médical. En effet, le stress oxydatif est un état de déséquilibre entre les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les mécanismes de défense. Lorsque le stress oxydatif devient trop élevé, une situation pathologique peut être atteinte, provoquant des lésions tissulaires cellulaires telles que des protéines, des lipides et des acides nucléiques menant à la mort cellulaire. Par conséquent, pour améliorer le mécanisme de défense de la cellule, l'utilisation de molécules antioxydantes est nécessaire (Shahidi et Zhong, 2015). Les molécules chimiques à savoir la tert-butylhydroquinone (TBHQ), l'hydroxyanisolebutylé (BHA), le gallate de propyle (PG) ou l'hydroxytoluène butylé (BHT) sont largement utilisés dans les industries alimentaires et cosmétiques. Cependant, leur utilisation est remise en cause en raison des risques toxicologiques potentiels et de la cancérogenèse (Petera et al., 2015). C'est pourquoi, et compte tenu de la volonté des consommateurs de revenir à l'utilisation de produits naturels, la recherche de biomolécules antioxydantes a suscité l'intérêt de grands laboratoires spécialisés.

Le monde naturel regorge de molécules possédant des applications dans divers domaines. Les phycobiliprotéines, principaux pigments trouvés chez les microalgues rouges, présentent plusieurs activités biologiques telles que les activités anti-inflammatoire, anti-obésité et anti-cancérigène. De plus, ils sont particulièrement exploités en tant que sonde fluorescente en cytométrie de flux et en microscopie ainsi que dans les industries alimentaires et cosmétiques en tant que colorants naturels. Ceci est en raison de leurs propriétés spectrales fluorescentes et colorantes. A titre d'exemple, on cite la B-phycoérythrine extraite à partir de *Porphyridium cruentum*. Cependant, les activités antioxydantes de cette molécule ont été très peu évoquées dans la littérature.

Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés au cours de ce chapitre à la recherche des activités antioxydantes du pigment protéique (B-phycoérythrine) de la microalgue rouge *P. marinum*. Comme indiqué dans la littérature, la production des pigments photosynthétiques est influencée par plusieurs facteurs à savoir la lumière, la température et la composition en

nutriments des milieux de culture. Ainsi, une optimisation des conditions de production de B-PE a été adoptée selon la méthodologie des plans d'expérience. Un plan de criblage de type Plackett-Burman a été mis en place suivant la matrice d'Hadamard afin de déterminer les facteurs influant la production de B-PE. L'optimisation des paramètres les plus significatifs a été réalisée en adoptant le plan d'expériences de type Box-Behnken. Cette méthodologie nous a conduit à la détermination des conditions optimales permettant d'augmenter la production de B-PE.

Une fois les conditions optimales de production ont été identifiées, nous avons purifié dans un premier temps la protéine extraite au moyen de la chromatographie échangeuse d'anions et ensuite nous l'avons caractérisée par électrophorèse SDS-PAGE.

A partir de cette molécule pure, plusieurs activités antioxydantes ont été testées à savoir : l'activité de piégeage du radical libre DPPH, le pouvoir réducteur, le pouvoir chélateur de fer et le pouvoir inhibiteur de l'oxydation de β -carotène.

Les résultats présentés dans ce chapitre ont fait l'objet d'une publication dans *International Journal of Biological Macromolecules*.

1. Criblage des facteurs via le plan Placket-Burman

P. marinum, comme toute microalgue cultivée en autotrophie, consomme de l'énergie lumineuse, de l'eau et des nutriments inorganiques pour se développer et réduire le CO₂ en composés complexes dont la phycoérythrine. Une étude préliminaire visant à cribler les facteurs influençant la production de B-PE a été réalisée en utilisant un modèle Plackett-Burman. Douze expériences (en double) ont été mises en place pour étudier l'effet des huit facteurs sélectionnés à savoir les concentrations en NaCl, NaNO₃, MgSO₄, CaCl₂ et K₂HPO₄, l'intensité lumineuse, les quantités de solution métallique et de solution vitaminique. Les données obtenues à partir du plan de criblage ont été ajustées à une équation polynomiale (21) du premier degré :

$$Y = 14,399 + 0,905 X_1 + 1,996 X_2 + 0,057 X_3 - 1,593 X_4 - 6,318 X_5 - 3,593 X_6 + 2,750 X_7 + 1,264 X_8 \quad (21)$$

La validité du modèle, résumée dans le **tableau 17**, a été confirmée par l'absence de test d'ajustement, qui n'a pas été significatif à 95% ($p = 0,063 > 0,05$). De plus, le R² ajusté de 0,797 révèle une assez bonne corrélation entre la réponse et les variables indépendantes.

Tableau 6 : Analyse de la variance (ANOVA) du modèle polynomial de premier degré

Source de variation	DDL	SS	MS	F-value	p-value
Régression	8	1663,66	207,958	12,2779	<0,0001
Résiduels	15	254,064	16,9376		
Manque d'ajustement	3	112,606	37,5353	3,18414	0,063
Erreur pure	12	141,458	11,7882		
Total	23	1917,73	83,3794		

SS: Somme des carrés, DDL: degrés de liberté, MS: Carré moyen, F-value: Test de Fisher

La signification statistique des huit variables a été déterminée par analyse de la variance (ANOVA). Parmi ces huit facteurs, seuls quatre : la concentration en NaNO₃ et K₂HPO₄, l'intensité lumineuse et le volume de solution métallique ont été significatifs ($p < 0,05$) avec un intervalle de confiance égal à 95% (**Tableau 18**). Ces termes significatifs, ayant un impact remarquable sur la réponse, jouent un rôle important dans la production de B-phycoérythrine alors que les termes non significatifs ont une influence négligeable.

Tableau 7: Coefficients de régression du modèle mathématique ajusté du plan Plackett-Burman

Plackett-Burman		
Facteurs	Coefficient de regression	p-value
Constant	14,399	<0,0001
NaCl (X1)	0,905	0,298
NaNO ₃ (X2)	1,996	0,031*
MgSO ₄ (X3)	0,057	0,946
CaCl ₂ (X4)	-1,593	0,077
K ₂ HPO ₄ (X5)	-6,318	<0,0001**
Intensité lumineuse (X6)	-3,553	0,00066**
Solution métallique (X7)	2,750	0,0051*
Solution vitaminique (X8)	1,264	0,153

*Significatif, **très significatif

Les résultats obtenus se sont avérés en accord avec les connaissances antérieures. En effet, il a été rapporté que de faibles intensités lumineuses et de faibles concentrations en phosphore favorisent la synthèse de la phycoérythrine (Dupré et al., 1994 ; Jahn et al., 1984 ; Kathiresan et al., 2007 ; Mihova et al., 1996). De plus, il a été montré que la production de phycoérythrine peut être améliorée par l'ajout de source d'azote qui sera mieux assimilée en présence d'ions métalliques (Dupré et al., 1994 ; Lin et al., 2012).

2. Optimisation de la production de B-phycoérythrine moyennant le plan Box-Behnken

En se basant sur le plan de criblage, la présence de quatre facteurs influant la production de B-phycoérythrine par *P. marinum* a été mise en évidence. Ces facteurs sont la concentration en NaNO₃ et K₂HPO₄ exprimée en g/L, l'intensité lumineuse exprimée en $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ et la solution métallique exprimée en mL/L.

Afin d'étudier l'effet de chaque paramètre et de leur interaction sur la réponse recherchée, un plan de vingt-sept expériences de type Box-Behnken a été adopté selon la méthodologie des surfaces de réponses. Les conditions opératoires ont été indiquées dans le **Tableau 19**. Les effets des concentrations en NaNO₃ et K₂HPO₄, de l'intensité lumineuse et de la solution métallique ont été testés de 0 à 3,4 g/L, 0 à 1,8 g/L, 70 à 230 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ et de 0,5 à 1,5 mL/L, respectivement.

Tableau 8: Conditions expérimentales et réponse obtenue suivant le plan Box-Behnken

EXP	Facteurs				Réponse
	NaNO ₃ (A)	K ₂ HPO ₄ (B)	Intensité lumineuse (C)	Solution métallique (D)	Y (mg/g MS)
1	-1	-1	0	0	20,904
2	+1	-1	0	0	35,054
3	-1	+1	0	0	5,970
4	+1	+1	0	0	10,117
5	0	0	-1	-1	20,49
6	0	0	+1	-1	10,688
7	0	0	-1	+1	29,207
8	0	0	+1	+1	17,598
9	-1	0	0	-1	11,613
10	+1	0	0	-1	19,870
11	-1	0	0	+1	18,725
12	+1	0	0	+1	25,739
13	0	-1	-1	0	33,022
14	0	+1	-1	0	9,05
15	0	-1	+1	0	19,74
16	0	+1	+1	0	4,166
17	-1	0	-1	0	7,374
18	+1	0	-1	0	20,626
19	-1	0	+1	0	2,537
20	+1	0	+1	0	8,872
21	0	-1	0	-1	35,244
22	0	+1	0	-1	14,292
23	0	-1	0	+1	42,383
24	0	+1	0	+1	20,828
25	0	0	0	0	16,201
26	0	0	0	0	15,526
27	0	0	0	0	15,883

2.1. Ajustement et validité du modèle

Les données obtenues à partir du modèle de Box-Behnken ont été ajustées à une équation polynomiale de second degré et la signification des coefficients du modèle a été évaluée par le test *t*Student en admettant un intervalle de confiance de 95% (le risque d'erreur $\alpha = 5\%$). Un coefficient n'est considéré significatif que lorsque la probabilité est inférieure à celle fixée (5%). En effet, le **Tableau 20** montre que ces quatre facteurs présentent un effet linéaire et quadratique significatif sur la réponse, ce qui confirme les résultats préliminaires trouvés avec le plan Plackett-Burman. En ce qui concerne l'effet des interactions entre les facteurs, nous notons que seules les interactions établies entre la solution de NaNO₃ et la solution métallique (A×D), la solution de K₂HPO₄ et la solution métallique (B×D) et entre l'intensité lumineuse et la solution métallique (C×D) ont un effet négligeable sur la production de phycoérythrine ($p > 0,05$). Par conséquent, ces variables ont été retirées du modèle initial et les données expérimentales ont été ré-analysées uniquement avec les paramètres significatifs ($p < 0,05$). Le modèle du second degré décrivant les relations entre les paramètres de culture et la production de B-PE (Y) s'écrit alors :

$$Y = 15,87 + 4,429 A - 10,160 B - 4,722 C + 3,565 D - 3,035 A^2 + 4,885 B^2 - 3,477 C^2 + 6,937 D^2 - 2,501 A \times B - 1,729 A \times C + 2,099 B \times C \quad (22)$$

Tableau 9: Coefficients de régression du modèle mathématique ajusté du plan Box-Behnken

Box-Behnken		
Facteurs	Coefficient de régression	p-value
Constante	15,87	< 0,0001
NaNO ₃ (A)	4,429	< 0,0001**
K ₂ HPO ₄ (B)	-10,160	< 0,0001**
Intensité lumineuse (C)	-4,722	< 0,0001**
Solution métallique (D)	3,565	< 0,0001**
A*A	-3,035	< 0,0001**
B*B	4,886	< 0,0001**
C*C	-3,476	< 0,0001**
D*D	6,937	< 0,0001**
A*B	-2,501	0,0011*
A*C	-1,729	0,0125*
A*D	-0,311	0,6074
B*C	2,099	0,0039*
B*D	-0,151	0,8024
C*D	-0,577	0,3469

La validité du modèle a été confirmée par le test de Fisher. En effet, le modèle de régression, reflétant la variation due à l'ensemble des facteurs, a une valeur de test égale à 196,282 qui est supérieure à la valeur critique du test de Fisher ($F_{\text{régression}} = 196,282 > F_{\text{tabulée}}(11, 15, 0,05) = 2,51$). On peut donc affirmer qu'avec 95% de confiance, les coefficients ont un effet significatif sur la production de B-PE. De plus, le R^2 ajusté de 0,988 révèle une très bonne corrélation entre la réponse et les variables indépendantes. Le modèle est également validé par le calcul du manque d'ajustement dont la valeur est inférieure à la valeur critique ($F_{\text{lack-of-fit}} = 12,301 < F_{\text{tabulée}}(13, 2, 0,05) = 19,42$) ce qui signifie que le modèle ne montre pas un manque d'ajustement (**Tableau 21**)

Tableau 10: Analyse de la variance (ANOVA) du modèle polynomial de second degré

Source de variation	DDL	SS	MS	F-value	p-value
Régression	11	2657,7	241,609	196,282	<0,0001
Résiduels	15	18,436	1,231		
Manque d'ajustement	13	18,236	1,403	12,301	0,078
Erreur pure	2	0,228	0,114		
Total	27	11649,5	431,462		

SS: Somme des carrés, DDL: degrés de liberté, MS: Carré moyen, F-value: Test de Fisher

2.2. Analyse de surface de réponse sur la quantité de B-PE extraits à partir de *Porphyridium marinum*

L'exploitation du modèle a été réalisée graphiquement en traçant dans un diagramme des courbes de réponse tridimensionnelles et bidimensionnelles dites courbes d'isoréponses. Cette représentation graphique (**Figure 31**) permet de visualiser la principale relation liant les niveaux de variables et la réponse. Chaque courbe d'isoréponses représente un nombre infini de combinaisons de deux variables avec un troisième et un quatrième constant.

Selon la **Figure 31A** et pour une intensité lumineuse et un volume de la solution métallique fixés à leurs niveaux zéro (150 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ et 1 mL/L respectivement), l'optimum de la production de B-PE a été atteint lorsque le milieu de culture ne contient pas de phosphore et que la concentration en NaNO_3 est fixée à 3,4 g/L (niveau (+1)). La **Figure 31B** a montré que la quantité de B-PE atteint son maximum à une intensité lumineuse proche de son niveau (-1) (70 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$) et à une concentration en NaNO_3 de 3,4 g/L (niveau (+1)) tout en maintenant la concentration de K_2HPO_4 à 0,9 g/L et le volume de la solution métallique à 1 mL/L. Les courbes d'isoréponses présentées sur la **Figure 31C** montrent que la production de B-PE peut être supérieure à 30 mg/g MS pour une intensité lumineuse de 70 μmol

photons/m²/s (niveau -1) et une concentration de K₂HPO₄ égale à 0 g/L (niveau -1) lorsque le volume de la solution métallique est fixé à 1 mL/L (niveau moyen) et que la concentration en NaNO₃ est égale à 1,7 g/L (niveau moyen).

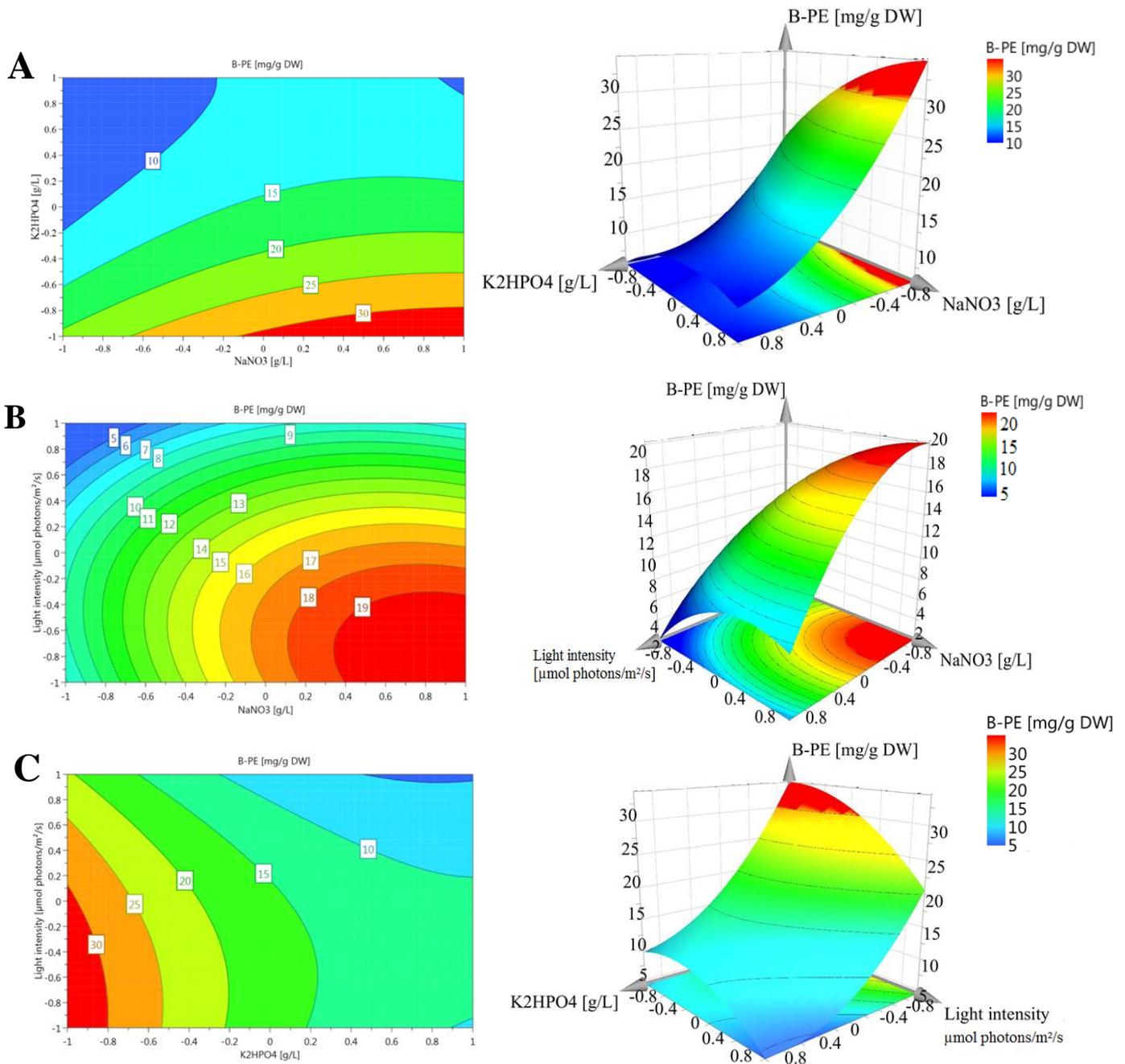


Figure 15 : Courbes d'isoréponses en 3D (à droite) et 2D (à gauche) illustrant l'effet des interactions les plus significatives sur la production de B-PE par *P. marinum* : (A) NaNO₃ et K₂HPO₄; (B) NaNO₃ et intensité lumineuse; (C) K₂HPO₄ et intensité lumineuse.

Une production optimisée de B-phycoérythrine par *P. marinum* pourrait donc être obtenue avec une augmentation de la concentration en NaNO_3 et du volume de la solution métallique, une diminution de l'intensité lumineuse et un déficit en source de phosphore. En effet, l'exécution du modèle donne une quantité maximale de B-phycoérythrine à 40 mg/g MS pour une concentration en NaNO_3 et K_2HPO_4 égale à 3,4 g/L et 0 g/L respectivement, à une intensité lumineuse de 70 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ et un volume de la solution métallique égal à 1,5 mL/L.

Les résultats précédents montrent bien que cette microalgue rouge a la capacité d'adapter son contenu en phycobiliprotéines (PBP) aux conditions environnementales et nutritionnelles. L'énergie lumineuse est un facteur important catalysant la photosynthèse chez les microalgues. Cependant, contrairement aux chlorophycées, les microalgues rouges sont généralement retrouvées dans des zones de mer profondes, et sont donc plus tolérantes aux faibles irradiations en raison de leur équipement photosynthétique riche en phycobilisomes (Akimoto et al., 2012 ; Marquardt et al., 1995). Des études antérieures, portant sur d'autres genres et espèces de microalgues, ont montré que le contenu en phycobilisome peut varier fortement en fonction de la qualité de la lumière (telle que la longueur d'onde (Farges et al., 2009), mais également de l'intensité lumineuse. À titre d'exemple, la teneur en phycoérythrine a augmenté en réponse à la diminution de l'intensité lumineuse pour *Porphyridium cruentum* et *Porphyridium aerugineum* (Jahn et al., 1984), *Rhodella reticulata* (Mihova et al., 1996) et *Rhodospirillum rubrum* (Dupré et al., 1994). En 1984, Jahn et al. ont montré que les microalgues rouges *P. cruentum* et *P. aerugineum* adaptent leur teneur en phycobiliprotéines en fonction des intensités lumineuses appliquées. En effet, la quantité du pigment protéique dans les cellules soumises à faible intensité lumineuse (220 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$, équivalent à 10,1 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$) est trois fois plus élevée que lorsque les cellules sont cultivées à haute intensité (3200 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$, équivalent à 146,9 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$). De plus, *R. marinum* a également été testée pour sa capacité à adapter sa teneur en phycobiliprotéines à la quantité de lumière incidente. En effet, la teneur en phycoérythrine représente plus de 50% des protéines totales à 50 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ et elle est deux fois plus importante que les valeurs obtenues à forte intensité lumineuse (Dupré et al., 1994). Il a également été démontré que la teneur en phycobiliprotéines chez *R. reticulata* a augmenté de 11,35% à 14,5% (m/m) lorsque la microalgue a été cultivée à faible intensité lumineuse (18 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$) (Mihova et al., 1996). Ces études sont en accord avec nos résultats sur l'effet de l'intensité lumineuse sur la production de B-phycoérythrine par *P. marinum*.

Outre les paramètres environnementaux, d'autres facteurs y compris la composition des milieux de culture peuvent avoir un effet sur la production des métabolites. En effet, les différentes substances minérales présentes dans le milieu de culture des microalgues sont impliquées dans la croissance et le métabolisme de ces microorganismes (Manirafasha et al., 2016). Dans notre étude, une augmentation de la concentration de la solution métallique ($MnSO_4$, $(NH_4)_6MoO_{24}$, $CoSO_4$, $CuSO_4$, $ZnSO_4$ et Fer-EDTA) dans le milieu de culture, stimule la production de B-PE. En effet, l'augmentation des ions métalliques permettrait une meilleure absorption de l'azote qui serait responsable de l'amélioration de la croissance cellulaire (Lin et al., 2012) et par conséquent de la production de B-PE. De plus, les oligo-éléments jouent un rôle important et crucial dans tous les systèmes biologiques en raison de leur rôle catalytique pour de nombreux cofacteurs essentiels (Tyihák and Móricz, 2016). Dans notre cas, la présence des ions métalliques à haute concentration pourrait catalyser la synthèse du cofacteur hème considéré comme une molécule clé dans la voie de biosynthèse des phycobilines (Manirafasha et al., 2016).

L'azote est une source importante non seulement pour la croissance cellulaire, mais également pour la production de phycobiliprotéines telles que la B-PE. En effet, la consommation de nitrate par les microalgues permet la production de deux molécules de glutamate dont l'une entre dans la voie de biosynthèse des phycobiliprotéines après son exportation dans le cytoplasme. Ainsi, le renouvellement des protéines dans les microalgues se maintient à partir de la protéolyse des phycobiliprotéines qui constituent les réserves cellulaires en cas de privation de source d'azote (Manirafasha et al., 2016). De plus, Chaloub et al. (2015) ont démontré qu'une carence en nitrate entraîne une diminution de la teneur en pigments photosynthétiques tels que la chlorophylle et les phycobiliprotéines. Cependant, dans le cas de *Rhodomonas sp.*, cet effet n'est pas immédiat puisque la microalgue adapte son métabolisme aux conditions de culture en stockant le nitrate dans les phycobiliprotéines (Dupré et al., 1994). En effet, pendant les premiers jours, la teneur en pigments reste constante, mais une fois que la microalgue s'adapte à la carence en azote (6 jours de privation d'azote), la teneur en chlorophylle diminue d'environ 50% et de 90% pour la phycoérythrine. Ce phénomène conduit à un verdissement des cultures de microalgues rouges selon Da Silva et al. (2009). Cependant, le processus de verdissement de *Rhodosorus marinus* s'est avéré réversible après 48h d'addition de nitrate ou d'ammonium et 30% de la phycoérythrine a été alors récupérée (Dupré et al., 1994). Dans la présente étude, le niveau de nitrate a été similaire à celui reporté

dans les recherches décrites ci-dessus montrant que l'accumulation de phycoérythrine est stimulée par l'augmentation de la concentration en nitrate.

En outre, comme il participe dans de nombreux processus métaboliques, à savoir le transfert d'énergie, la formation d'acides nucléiques et de phospholipides, le phosphore est un autre élément essentiel à la croissance des microalgues. Dans notre étude, *P. marinum* produit plus de B-PE dans des conditions de carence en phosphore. Ce résultat est en accord avec les travaux de Kathiresan et al. (2007), qui ont optimisé les facteurs influant sur la production de phycoérythrine à partir de *Porphyridium purpureum* et ont constaté que la production de PE atteint son maximum lorsque le phosphore est à son niveau bas. Ces résultats suggèrent qu'une déficience en phosphore peut conduire à la déviation du métabolisme de croissance vers le métabolisme de production des protéines, y compris les phycobiliprotéines, constituant les réserves de la cellule dans de telles conditions.

Les conditions de cultures déterminées par le modèle comme étant optimales pour la production de B-PE ont été mises en œuvre afin de vérifier l'adéquation entre le modèle et les résultats expérimentaux. Les cinétiques de croissance de *P. marinum* dans les conditions standard et optimisées sont présentées sur la **Figure 32**.

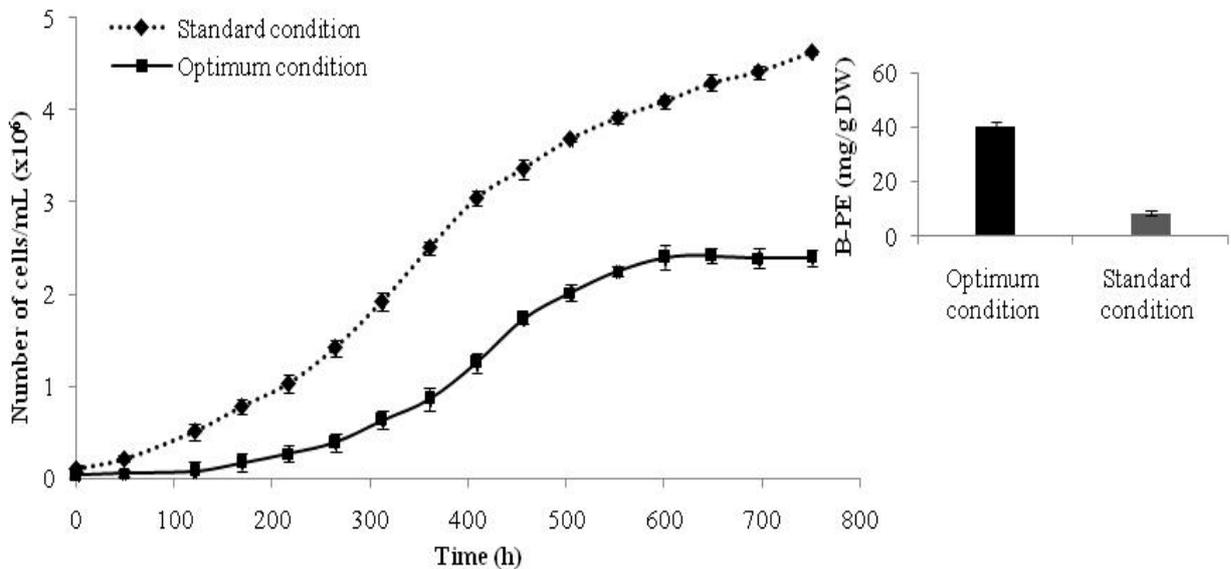


Figure 16: Comparaison entre les cinétiques de croissance et la production de B-phycoérythrine par *P. marinum* dans les conditions standard et optimisée

La croissance observée dans les conditions de carence en phosphate a été attribuée au fait qu'une quantité limitée de phosphate a été introduite dans le milieu avec l'inoculum puisque les pré-cultures ont été cultivées dans les conditions standard. Néanmoins, la croissance est arrêtée dès que l'épuisement s'est produit. Les cellules ont atteint un maximum égal à $4,6 \times 10^6 \pm 0,5 \times 10^6$ cellules/mL dans les conditions standard avec une production de B-PE égale à $8 \pm 0,7$ mg/g MS. Cependant, le nombre de cellules de *P. marinum* a diminué d'un facteur de 2 dans les conditions optimisées (concentration élevée en nitrate et carence en phosphate), tout en permettant d'atteindre une production de B-PE de $41 \pm 1,3$ mg/g MS.

Pour une application industrielle, l'accumulation de la molécule n'est cependant pas une condition suffisante pour permettre des rendements de production élevés. Il est important non seulement d'augmenter la productivité cellulaire (quantité par gramme de biomasse), mais également d'obtenir une quantité de biomasse importante afin d'avoir une productivité globale plus importante (gramme par litre de culture). Pour ce faire une stratégie en deux étapes peut être appliquée permettant d'atteindre dans un premier temps une concentration élevée en biomasse et dans un second temps de passer à une condition d'accumulation de la molécule cible. Ce mode de culture en deux étapes a été mis en œuvre pour la production de B-PE par *P. marinum*, avec une phase de croissance réalisée dans les conditions standard et une phase de production réalisée sur un milieu optimisé. Ces conditions de culture ont abouti à une quantité de biomasse sèche de 2 g contenant 79 mg de B-PE. Cette quantité est 2 et 4 fois plus importante que celle obtenue à partir de la souche microalgale *P. cruentum* (Bermejo et al., 2002 ; Tang et al., 2016).

3. Fractionnement et purification de B-PE

La B-PE obtenue au cours de la culture en deux étapes a été par la suite purifiée pour tester ses activités antioxydantes. Plusieurs méthodes, notamment les méthodes chromatographiques, ont été décrites pour purifier la B-PE. Ces méthodes peuvent conduire à des échantillons de grande pureté, mais le coût de traitement est élevé. Pour la purification à l'échelle industrielle, d'autres méthodes peuvent être utilisées, telle que l'ultrafiltration (Marcati et al., 2014) permettant de récupérer des extraits ayant une pureté inférieure (2,3), mais à un coût moindre. Dans notre étude et afin de tester les activités antioxydantes, un échantillon de haute pureté a été préféré, et la méthode chromatographique a été mise en œuvre.

La solubilité des protéines dans une solution aqueuse dépend des conditions ioniques et du pH. En effet, leur purification passe souvent par la précipitation au sulfate d'ammonium. Par conséquent, plusieurs chercheurs (Sonani et al., 2014 ; Soni et al. 2006, 2008) ont travaillé sur la précipitation des phycobiliprotéines en se basant sur la précipitation différentielle par le sulfate d'ammonium. La séparation de la phycoérythrine des autres phycobiliprotéines (PE, PC et APC) est difficile en raison de leur faible résolution hydrophobe. Pour cette raison, la purification de B-PE a été effectuée en utilisant deux étapes de précipitation à 20% pour éliminer les impuretés et les protéines autres que les PBP, puis à 40% pour séparer les PE des PC et des APC (phycourobilines). Après précipitation, la fraction B-PE, obtenue avec un rapport de pureté égal à 2,8 (**Tableau 22**), a été purifiée par Chromatographie échangeuse d'anions en utilisant une colonne DEAE Cellulose. Cette purification a donné un échantillon avec un indice de pureté élevé (5) avec un rendement en B-PE de 73%.

L'analyse du chromatogramme obtenu, ne montre aucun pic à 620 nm, ce qui indique l'absence de phycourobilines (PC et APC) dans l'échantillon de B-PE purifié. Par ailleurs, une faible absorption dans la région de 280 nm a été observée, suggérant une faible quantité de protéines dans l'éluat, ce qui est en accord avec l'indice de pureté élevé en B-PE (**Figure 33**). Ces résultats sont en accord avec les études publiées sur la purification de B-PE chez d'autres espèces de *Porphyridium* (Bermejo et al., 2003a ; Sonani et al., 2014 ; Tang et al., 2016).

Tableau 11 : Etapes de purification de la B-phycoérythrine à partir de *P. marinum*

	Extrait Brut	Précipitation	DEAE-Cellulose
Protéines totales (mg)	151	81	62
B-PE (mg)	79	64	57
% B-PE dans les protéines totales	52	79	92
Rendement en B-PE (%)	100	81	72
Pureté (A_{545}/A_{280})	1,2	2,8	5

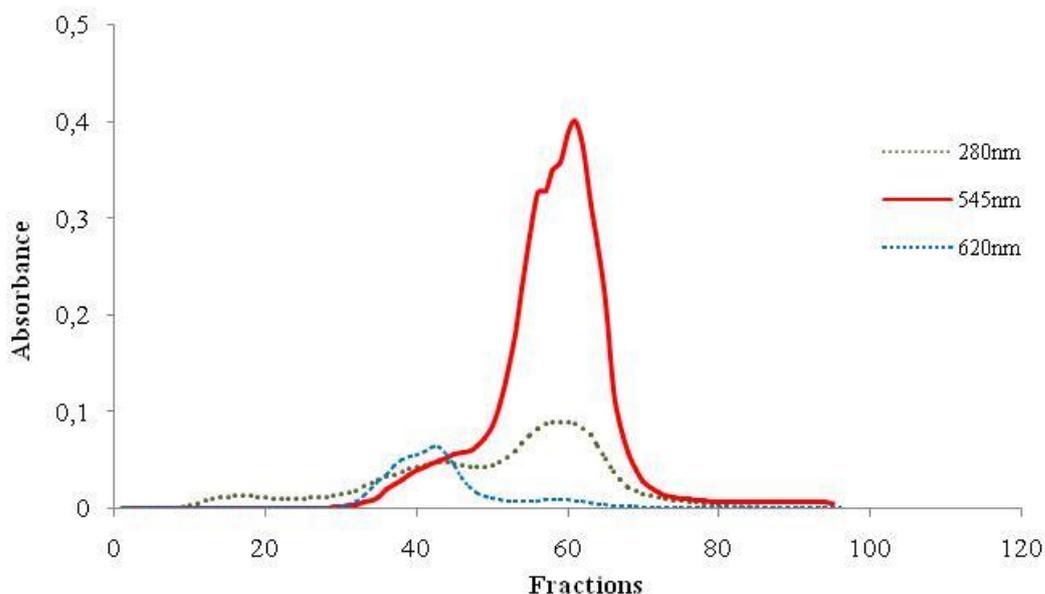


Figure 17: Profil d'élution de B-PE sur colonne DEAE-Cellulose : (.....) $\lambda = 280$ nm pour la détection de protéines, (—) $\lambda = 545$ nm pour la détection de B-PE et (.....) $\lambda = 620$ nm pour la détection de PC

Bermejo et al. (2002) et Marcati et al. (2014) ont rapporté que la B-PE extraite de *P. cruentum* est constituée de trois sous-unités α , β et γ dont la masse moléculaire varie de 17 à 33 kDa. Ceci a été confirmé au cours de ce présent travail par la caractérisation de la B-PE pure par électrophorèse SDS-PAGE. En effet, l'analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12%, illustré dans la **Figure 34**, a montré que le profil de l'extrait protéique obtenu à partir de la colonne DEAE-Cellulose révèle une large bande comprise entre 17 et 22 kDa qui pourrait être attribuée aux sous-unités α et β et une autre bande de 32 kDa attribuée à la sous-unité γ .

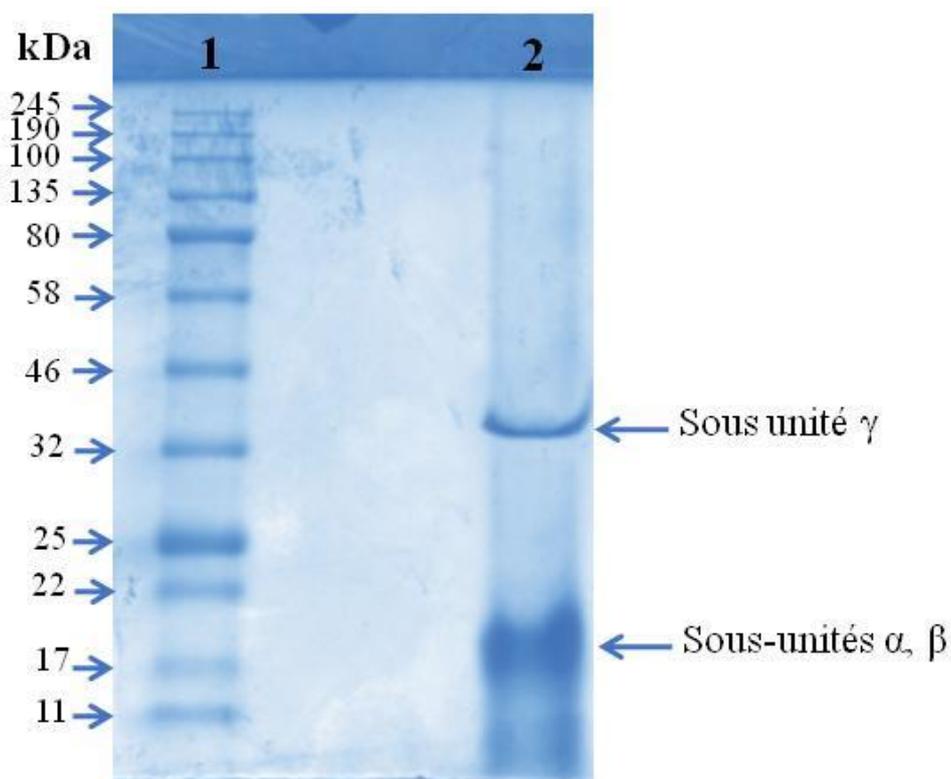


Figure 18: Analyse SDS-PAGE du B-PE purifié à partir de *P. marinum*. (1) marqueur de poids moléculaire. (2) Fraction B-PE après élution par DEAE-Cellulose.

4. Evaluation de l'activité antioxydante de la B-PE

L'activité antioxydante de la B-PE extraite de *P. marinum* a été évaluée par quatre tests anti-oxydants *in vitro* : activité de piégeage du DPPH, pouvoir réducteur, test de chélation du fer ferreux et test de blanchiment au β -carotène. Ces expériences appartiennent à deux catégories de réactions basées sur le transfert d'atomes d'hydrogène (THA) et le transfert d'électrons (ET). Un pouvoir antioxydant élevé de la B-PE pourrait justifier un intérêt nutritionnel bénéfique en relation avec son effet thérapeutique et protecteur contre les dommages oxydatifs.

4.1. Pouvoir du piégeage du radical DPPH

Le dosage du pouvoir de piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle est l'une des méthodes les plus utilisées pour évaluer l'activité antioxydante d'un composé. En effet, le pourcentage d'inhibition du DPPH par la B-PE, qui est révélé par le blanchiment de la solution du radical colorée en violet, est représenté sur la **Figure 35**. Les résultats obtenus indiquent que pour chaque concentration testée, la B-PE présente une activité antioxydante

contre les radicaux DPPH, qui est assez proche du contrôle positif, l'acide ascorbique (vitamine C). L'activité de piégeage de ce radical par la B-PE atteint $91 \pm 0,55\%$ à une concentration égale à $100 \mu\text{g/mL}$. De plus, la détermination de l'activité de piégeage des radicaux libres est généralement exprimée en IC_{50} correspondant à la quantité d'antioxydant nécessaire pour inhiber 50% de la concentration initiale de DPPH. Une valeur IC_{50} inférieure indique une activité antioxydante plus élevée. La valeur IC_{50} de la B-PE purifiée est d'environ $10 \mu\text{g/mL}$, soit deux fois supérieure à celle de l'acide ascorbique utilisé (environ $5 \mu\text{g/mL}$). Cela suggère que la B-PE a une activité de piégeage inférieure à celle de la vitamine C, mais elle est considérée comme un puissant piègeur des radicaux libres par rapport aux autres phycoérythrine extraites de *Microchaete* ($43 \mu\text{g/mL}$) (Hemlata et al., 2018) et de *Lyngbyasp.* AO9DM ($233 \mu\text{g/mL}$) (Sonani et al., 2014). Par conséquent, la B-PE pourrait contenir des séquences protéiques qui agissent comme donneur d'atome d'hydrogène pour former un produit DPPH-H stable.

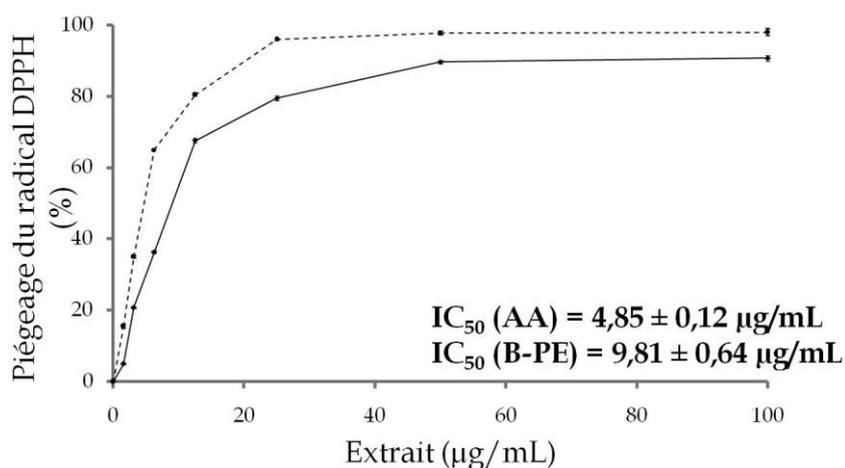


Figure 19: Activité de piégeage du radical DPPH par la protéine B-PE. (---●---) contrôle positif : acide ascorbique (AA), (—◆—) B-PE

4.2. Pouvoir chélateur du fer

La transition des ions métalliques peut stimuler l'oxydation des lipides *via* la réaction de Fenton en décomposant les hydroperoxydes lipidiques en radicaux peroxyde et alcoxyde plus réactifs. La B-PE purifiée a été testée pour sa capacité à chélater le complexe Fe^{2+} -ferrozine mis en évidence par un suivi d'absorbance à 562nm . La **Figure 36** montre que la B-PE a une activité chélatante élevée de $83 \pm 0,33\%$ à $100 \mu\text{g/mL}$ et une IC_{50} égale à $13,91 \pm 0,21 \mu\text{g/mL}$. Cette activité est significativement plus faible que celle de l'EDTA ($\text{IC}_{50} = 3,15 \pm 0,71$), mais relativement plus élevée que celle des phycobiliprotéines, extraites et purifiées à partir de

Lyngbya sp. (Sonani et al. 2014). L'IC₅₀ de ces phycobiliprotéines a été respectivement de 121 µg/mL, 81 µg/mL et 102 µg/mL pour PE, PC et APC. Il a été rapporté aussi que l'extrait éthanolique de *Lavandula hybrida* présente une valeur d'IC₅₀ d'environ 50 µg/mL dans le test de chélation des ions ferreux en raison de sa richesse en polyphénols (Robu et al., 2012). De plus, Hazra et al. (2008) ont testé le pouvoir de chélation du fer de l'extrait méthanolique de la plante *Spondias pinnata*. Cette dernière, contenant des composés phénoliques, dont l'acide gallique et des flavonoïdes équivalents à la quercétine, a montré une activité avec une IC₅₀ égale à 67 µg/ml. Enfin, les polysaccharides sulfatés extraits de l'algue brune *Laminaria japonica* inhibent le complexe Fe²⁺-ferrozine à un taux égal à 29,48% en utilisant une concentration de 0,76 mg/ml (Wang et al., 2008). Selon ces résultats, certaines molécules biologiques telles que les flavonoïdes, les polyphénols et les polysaccharides sont capables d'inhiber les ions métalliques pro-oxydants et d'empêcher ainsi la peroxydation des lipides. Néanmoins, la B-PE purifiée extraite de *P. marinum* a un pouvoir chélatant du fer très important par rapport à ces molécules.

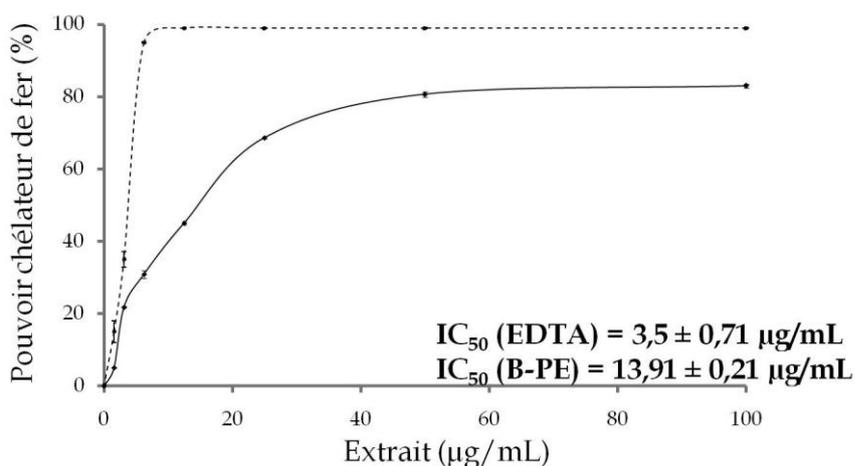


Figure 20: Pouvoir chélateur du fer par la B-PE extraite de *P. marinum*. (---●---) contrôle positif : EDTA, (—◆—) B-PE

4.3. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur de la B-PE est associé à son pouvoir antioxydant. Cette technique permet de mesurer la capacité de l'extrait protéique à réduire le fer ferrique (Fe³⁺) présent dans le complexe K₃Fe(CN)₆ en fer ferreux (Fe²⁺). Cette propriété réductrice est associée à la présence d'agents réducteurs qui sont capables de donner un électron. Comme le montre la **Figure 37**, l'augmentation de l'absorbance à 700 nm indique un pouvoir réducteur puissant de la protéine (B-PE). Néanmoins, cette activité s'est avérée inférieure à celle de l'acide

ascorbique. En effet, à 100 $\mu\text{g/mL}$, la DO atteint respectivement, $0,458 \pm 0,02$ et $0,758 \pm 0,01$ pour la B-phycoérythrine et la vitamine C. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par Sonani et al. (2014) et Patel et al. (2018) sur la PE extraite de *Lyngbya sp.* (OD $\sim 0,600$) et de *Halomicronema* (OD $\sim 0,650$), respectivement. Les résultats mentionnés ci-dessus suggèrent que le pouvoir réducteur pourrait être lié à la présence de groupements protéiques qui réagissent avec les radicaux libres en les convertissant en produits plus stables.

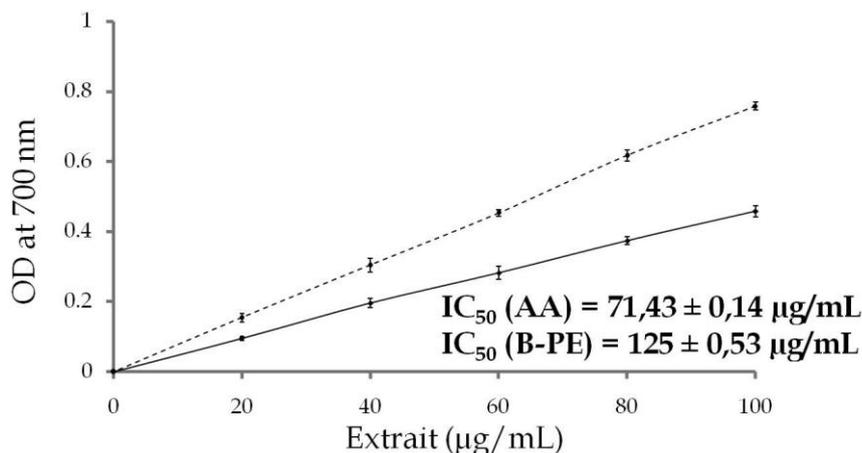


Figure 21: Pouvoir réducteur de la molécule B-PE. (---●---) contrôle positif : Acide ascorbique (AA), (—◆—) B-PE

4.4. Activité inhibitrice de l'oxydation du β -carotène

La B-PE a également été testée dans un système aqueux émulsifié pour évaluer sa capacité à inhiber la peroxydation lipidique. En effet, le test de blanchiment du β -carotène est basé sur la capacité d'un antioxydant à neutraliser les radicaux libres générés lors de l'oxydation de l'acide linoléique. Par conséquent, la présence de molécules bioactives dans l'émulsion composée de β -carotène, d'acide linoléique et d'eau empêche la perte de la couleur orange du β -carotène.

La B-PE purifiée de *P. marinum* présente une activité antioxydante intéressante. En effet, elle a été capable d'inhiber le blanchiment du β -carotène à une concentration de 100 $\mu\text{g/mL}$ avec un pourcentage d'inhibition égal à $85 \pm 0,53\%$. De plus, la B-PE a eu une activité antioxydante plus forte ($\text{IC}_{50} = 11,94 \pm 0,13 \mu\text{g/mL}$) que le BHT, utilisé comme contrôle positif pour ce test ($\text{IC}_{50} = 23,22 \pm 0,64 \mu\text{g/mL}$) (**Figure 38**).

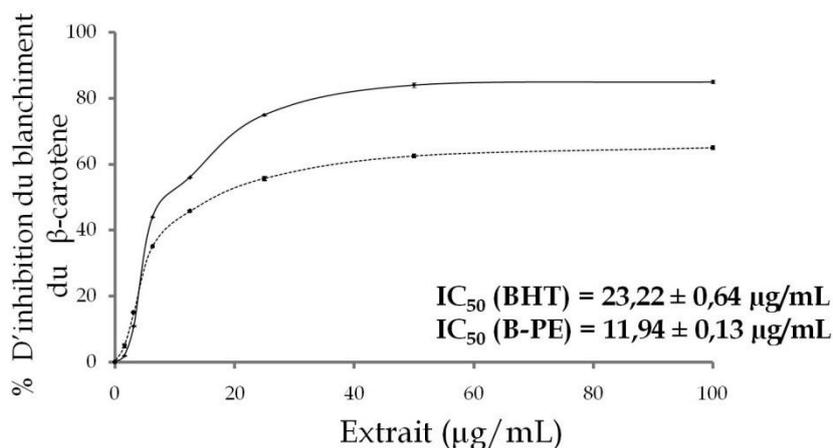


Figure 22: Capacité du B-PE à inhiber le blanchiment du β-carotène. (---●---) contrôle positif : BHT, (—◆—) B-PE

5. Relation composition en acides aminés et activités antioxydantes

A regard des résultats présentés ci-dessus, la B-PE pourrait être une alternative aux produits de synthèse utilisés sur le marché à savoir la tert-butylhydroquinone (TBHQ), l'hydroxyanisolebutylé (BHA), le gallate de propyle (PG) ou l'hydroxytoluène butylé (BHT). Afin de savoir si la composition en acides aminés de la B-PE sont impliquées dans l'activité antioxydante, la séquence des acides aminés de l'apoprotéine B-phycoérythrine des microalgues rouges *P. sordidum*, *P. purpureum* et *P. cruentum* a été étudiée. En effet, un pourcentage de similarité de 90% a été détecté entre les deux sous-unités α et β de ces micro-organismes (www.uniprot.org). Cela suggère que la séquence protéique des sous-unités n'a pas évolué avec l'apparition des espèces. De plus, notre microalgue rouge *P. marinum* a la même classification que *P. cruentum*, *P. purpureum* et *P. sordidum* (Rhodophyta, Porphyridiophyceae, Porphyridiales, Porphyridiaceae, Porphyridium) (www.algaebase.org). Pour ces raisons, la séquence de la B-PE a été analysée par ExPASy-ProtParam (**Tableau 23**) et il a été démontré que les sous-unités α et β avaient respectivement 38 et 33 résidus chargés. Ces résidus chargés positivement (Arg + Lys) et négativement (Asp + Glu) peuvent contribuer à l'activité antioxydante totale de la B-PE par leur capacité à séquestrer les radicaux libres et les ions métalliques, comme démontré par Patel et al. (2018). En outre, de nombreuses recherches (Karkouch et al., 2017 ; Patel et al., 2018 ; Sonani et al., 2014 ; Sarmadi et al., 2012) ont noté que les acides aminés hydrophobes ont une activité antioxydante importante en raison de leur capacité à donner des protons et à chélater des ions métalliques. Dans notre cas, les sous-unités α et β contiennent respectivement environ 50% et

52% d'acides aminés hydrophobes (Ala, Cys, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Tyr, Val). De plus, l'histidine et les acides aminés contenant des résidus aromatiques (Phe, Tyr, Trp) peuvent également contribuer à l'activité antioxydante. Par conséquent, les propriétés antioxydantes de la B-PE mises en évidence par l'activité de piégeage du DPPH, la chélation des ions ferreux, le pouvoir réducteur et le test de blanchiment du β -carotène, pourrait résulter de la capacité de ses acides aminés à donner des électrons et à chélater les ions métalliques. Enfin, la distribution des résidus dans la structure 3D de la B-PE est un autre facteur pouvant affecter l'activité antioxydante (Patel et al., 2018).

Tableau 12: Séquence d'acides aminés des sous-unités α et β de B-PE analysées par l'outil ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>)

Souches	Acides aminés	Sous-unité α		Sous-unité β	
		No.	Abondances (%)	No.	Abondances (%)
<i>P. sordidum</i> <i>P. cruentum</i> <i>P. purpureum</i>	Ala (A)	24	14,6	26	14,7
	Arg (R)	10	6,1	10	5,6
	Asn (N)	9	5,5	10	5,6
	Asp (D)	10	6,1	11	6,2
	Cys (C)	3	1,8	6	3,4
	Gln (Q)	4	2,4	2	1,1
	Glu (E)	11	6,7	6	3,4
	Gly (G)	12	7,3	13	7,3
	His (H)	2	1,2	0	0,0
	Ile (I)	8/ (7*)	4,9	11	6,2
	Leu (L)	13	7,9	14	7,9
	Lys (K)	7	4,3	6	3,4
	Met (M)	3	1,8	6	3,4
	Phe (F)	3	1,8	5	2,8
	Pro (P)	5	3,0	3	1,7
	Ser (S)	11	6,7	20	11,3
	Thr (T)	6	3,7	7	4,0
	Trp (w)	1	0,6	0	0,0
	Tyr (Y)	10	6,1	6	3,4
	Val (V)	12/ (13*)	7,3	15	8,5
	Pyl (O)	0	0,0	0	0,0
	Sec (U)	0	0,0	0	0,0
	Total	164	100	177	100
	Nombre total de résidus chargés négativement (Asp+Glu)	21		17	
	Nombre total de résidus chargés positivement (Arg+Lys)	17		16	

*Composition en acides aminés de *P. cruentum* et *P. purpureum*

Conclusion

Dans ce chapitre, la production du pigment protéique B-PE par la microalgue rouge *Porphyridium marinum* a été optimisée puis celui-ci a été testé pour son activité antioxydante. En effet, dans un premier volet, nous nous sommes proposés d'optimiser, moyennant la méthodologie des plans d'expériences, les conditions de culture de *P. marinum* pour l'obtention de teneurs élevées en pigment B-PE. Huit paramètres à savoir la concentration en NaCl, NaNO₃, MgSO₄, CaCl₂ et K₂HPO₄, l'intensité lumineuse, la solution métallique et la solution vitaminique ont été sélectionnés conformément au plan Plackett-Burman dans le but de déterminer les facteurs les plus influents. Parmi ces facteurs, quatre ont été choisis comme paramètres les plus significatifs et ont été par la suite optimisés en adoptant le plan Box-Behnken. Le but de ce plan était d'obtenir une meilleure production de la protéine B-PE à partir de *P. marinum*. L'analyse statistique du modèle mathématique conçu par le plan Box-Behnken a montré que le maximum de B-PE de 40 mg/g MS peut être atteint lorsque la microalgue est cultivée sous une intensité lumineuse de 70 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ et dans un milieu de culture dépourvu en source de phosphore (K₂HPO₄ = 0 g/L), mais contenant une concentration en NaNO₃ égale à 3,4 g/L et un volume de solution métallique égal à 1,5 mL/L. Ces conditions de culture ont été mises en œuvre, avec une stratégie en 2 étapes, permettant dans un premier temps d'obtenir une quantité de biomasse élevée puis d'induire l'accumulation de B-PE. La quantité de B-PE produite s'est avérée conforme à la prédiction du modèle (~40 mg/g), plus élevée que dans les conditions de culture standards (~8 mg/g), et jugée intéressante par rapport aux travaux antérieurs reportés pour d'autres microalgues rouges.

La B-PE a été purifiée sur une colonne DEAE-Cellulose échangeuse d'anions après deux étapes de précipitation au sulfate d'ammonium. Cette purification a permis d'obtenir une fraction de haute pureté (5) avec un rendement en B-PE de 73%. Ensuite, l'analyse qualitative de la structure oligomérique de la B-PE par SDS-PAGE a mis en évidence la présence de

deux sous unités α et β de masse moléculaire comprise entre 17 et 22 kDa et une sous unité γ de 32 kDa.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à évaluer les activités antioxydantes de la protéine B-PE. Plusieurs propriétés biologiques de cet extrait protéique ont été révélées. En effet, cette molécule a montré une puissante activité antioxydante en termes de piégeage des radicaux libres DPPH, chélation et réduction des ions de fer et inhibition de la décoloration de la β -carotène. Enfin la caractérisation préliminaire des sous-unités de la B-PE et l'identification des acides aminés ont fourni des arguments solides pour considérer cette protéine comme un candidat naturel potentiellement intéressant pour prévenir la formation des radicaux libres.

Compte-tenu de ces résultats, nous pouvons envisager que la protéine B-PE extraite de la souche microalgale *P. marinum* pourrait être une alternative thérapeutique dans plusieurs applications. En effet, elle peut entrer dans l'avenir dans les formulations pharmaceutiques ou cosmétique ainsi que dans les formulations alimentaires.

*Conclusion générale et
perspectives*

Cette étude entre dans le cadre d'un programme de recherche visant à produire et à identifier des molécules de sources naturelles ayant des propriétés biologiques à haute valeur ajoutée et pouvant être exploitées dans les domaines agroalimentaire et/ou thérapeutique. Actuellement, un grand intérêt a été porté sur les molécules bioactives produites à partir des microalgues notamment les microalgues rouges. Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés à la production et à la caractérisation des métabolites de la microalgue rouge *Porphyridium marinum*, cultivée dans différentes conditions de cultures. Ces molécules ont été par la suite étudiées pour leurs activités biologiques et antioxydantes.

La première partie de ce travail a consisté en la mise en place de cultures de *P. marinum* en photoautotrophie, mixotrophie et hétérotrophie. Dans un premier temps, des méthodes de purification (physique et chimique) ont été mises en œuvre afin de purifier la culture de *P. marinum* et pouvoir la cultiver par la suite en présence d'une source de carbone organique « l'acétate de sodium ». Après culture, des suivis de croissance (par comptage sur cellule de Malassez) et de consommation des sources d'azote (nitrate, par dosage spectrophotométrique) et de carbone (acétate par dosage en HPLC) ont été réalisés. Les premiers résultats ont montré que *Porphyridium marinum* n'est pas capable de se développer en hétérotrophie. En revanche, les cultures en mixotrophie sont possibles.

A l'issue de ces premiers résultats, la suite du travail a porté sur des cultures autotrophe et mixotrophe. Le suivi de la croissance cellulaire ainsi que la production de métabolites a montré que la condition mixotrophique favorise la production des biomolécules à savoir les lipides et les pigments. Les lipides ont été caractérisés par chromatographie en phase gazeuse, montrant que le profil en acides gras est approprié pour l'alimentation humaine vu leur composition riche en acide gras polyinsaturé (50%) tel que l'acide arachidonique et l'acide oléique. La production élevée des pigments indique que le carbone organique stimule la production des chlorophylles, des caroténoïdes ainsi que des phycoérythrine. En ce qui concerne les exopolysaccharides, leur production a été légèrement différente en mixotrophie et en autotrophie. Une caractérisation structurale en utilisant la chromatographie échangeuse d'anions couplée à un détecteur à ampérométrie pulsée (HPAEC-PAD) et le spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) a été faite. Les résultats ont montré que ces extraits polysaccharidiques issus des deux conditions de culture mixotrophe et autotrophe ont les mêmes groupements fonctionnels. A l'issue de cette étude comparative, il apparaît que la culture mixotrophe peut être une nouvelle stratégie à adopter par les industriels étant donné qu'elle permet à la fois l'augmentation de la productivité de biomasse microalgale et la

production des molécules d'intérêt. Une variation de ses paramètres à savoir l'intensité lumineuse ou la nature de la source de carbone organique pourrait améliorer d'avantage la production des métabolites recherchés. Cette première partie de travail de thèse pourrait être complétée par une caractérisation structurale des métabolites majoritaires produits par *Porphyridium marinum* et en particulier la détermination des liaisons glycosidiques des exopolysaccharides par GC-MS et RMN. De plus et afin de comprendre les différentes voies métaboliques impliquées dans les cultures autotrophes et mixotrophes, des études transcriptomiques et protéomiques seraient d'une grande importance dans les futurs travaux.

Dans la suite de ce travail et afin de valoriser les métabolites produit par la microalgue rouge, les exopolysaccharides (natifs et après passage à l'homogénéisateur Haute Pression, EPS-2P et EPS-5P) ont été évalués pour leur potentiel biologique contre la multiplication des bactéries pathogènes, des cellules cancéreuses et contre la formation de biofilm de microorganismes nocifs. Les résultats qui en découlent ont montré que les bactéries de référence à savoir *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus* méticilline résistante (SMR), *Escherichia Coli* ATCC 25922 et *Salmonella* Enteridis sont sensibles aux différentes fractions polysaccharidiques testées à différentes concentrations. Le polysaccharide natif (EPS-0P) a été le plus actif sur les bactéries à Gram (-) (*E. coli* et *Salmonella*) que sur les bactéries à Gram (+) (*Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus* méticillinerésistante). De plus, ces exopolysaccharides se sont révélés particulièrement actifs contre la formation du biofilm de *Candida albicans*. En effet, la meilleure activité a été détectée chez l'EPS-0P montrant une inhibition importante maximale de 94% de la formation du biofilm à une concentration égale à 31,3 µg/mL, efficacité supérieure à ce qui a été reporté jusqu'à présent dans la littérature pour des EPS d'autres plantes. En ce qui concerne l'activité anticancéreuse, les polysaccharides (EPS-2P et EPS-5P), obtenus après passage à l'homogénéisateur à haute pression, ont réduit la viabilité des cellules cancéreuses de 50% au bout de 24h à une concentration de 2 mg/mL contrairement au polysaccharide natif qui n'a présenté aucune activité. A regard de ces résultats, la nature des séquences et des groupements fonctionnels des polysaccharides, leurs comportements rhéologiques dans le milieu réactionnel ainsi que leur poids moléculaire sont des facteurs clés déterminants dans l'atténuation ou la promotion de ces différentes activités biologiques. L'extrait polysaccharidique de *P. marinum* pourrait être alors une alternative thérapeutique prometteuse contre le biofilm de *Candida albicans*, contre la multiplication des bactéries pathogènes ainsi que les cellules cancéreuses. En effet, il

pourrait être additionné dans les formulations pharmaceutiques seules ou en association avec des antifongiques ou des antibiotiques conventionnels.

Un autre volet a été exploré au cours de ces années de thèse concernant l'optimisation des conditions de production de B-phycoérythrine, pigment majoritaire chez *Porphyridium marinum*. Un plan de criblage de type Plackett-Burman a été mis en place suivant la matrice d'Hadamard. Quatre facteurs se sont révélés les plus influents sur la production du pigment à savoir la source d'azote, de phosphore, l'intensité lumineuse et les micronutriments. L'optimisation de ces paramètres a été réalisée en adoptant le plan d'expériences de type Box-Behnken afin d'avoir une meilleure production du pigment recherché. Cette méthodologie nous a conduit à la détermination des conditions optimales permettant d'augmenter la production de la B-PE par *P. marinum*. Par la suite, une purification de cette molécule d'intérêt optimisée a été faite avec une pureté élevée égale à 5. La présente étude a été achevée par une mise en évidence de plusieurs activités antioxydantes de la B-PE de *P. marinum* à savoir : la capacité à piéger le radical libre DPPH, réduire et chélater l'ion ferrique et inhiber la décoloration du β -carotène. La relation structure/fonction a été déterminée après analyse *in silico* de la séquence protéique de la B-phycoérythrine. En effet, la présence des résidus chargés positivement et négativement et des acides aminés hydrophobes contribuent à l'activité antioxydante totale en séquestrant les radicaux libres et les ions métalliques. Certaines de ces activités se sont révélées être proches voir supérieure à l'activité des molécules chimique témoins. Ce potentiel antioxydant fait de l'extrait protéique un candidat potentiel pouvant être utilisé dans le domaine pharmaceutique, cosmétique ou alimentaire dans le but de traiter des pathologies liées à la formation des radicaux libres. Il serait alors intéressant de tester ces activités antioxydantes *in vivo*.

*Références
bibliographiques*

A

Abd-Ellatef G.F., Ahmed O.M., Abdel-Reheim E.S., Abdel-Hamid A.Z., *Ulva lactuca* polysaccharides prevent Wistar rat breast carcinogenesis through the augmentation of apoptosis, enhancement of antioxidant defense system, and suppression of inflammation. *Breast Cancer* 9 (2017), 67–83.

Ahern T.J., Katoh S., Sada E., Arachidonic acid production by the red alga *Porphyridium cruentum*. *Biotechnol. Bioeng.* 25 (1983), 1050–1070.

Aizawa K., Miyachi S., Carbonic anhydrase and CO₂ concentrating mechanisms in microalgae and cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 39 (1986), 215–233.

Akimoto S., Yokono M., Hamada F., Teshigahara A., Aikawa S., Kondo A., Adaptation of light-harvesting systems of *Arthrospira platensis* to light conditions, probed by time-resolved fluorescence spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta. Bioenerg.* 1817 (2012), 1483–1489.

Amorim R., Rodrigues J., Holanda M., Quinderé A., Paula R., Melo V.M.M., Benevides N.M.B., Antimicrobial effect of a crude sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria ornate*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 55(2012), 171–181.

Amoroso G., Sultemeyer D., Thyssen C., Fock H.P., Uptake of HCO₃⁻ and CO₂ in cells and chloroplasts from the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Dunaliella tertiolecta*. *Plant Physiol.* 116 (1998), 193–201.

Arad S., Huliheil M., Tal J., Antiviral agents, WO1997000689A1, 1995.

Arad S., Lerental Y., Dubinsky O., Effect of Nitrate and Sulfate Starvation on Polysaccharide Formation in *Rhodella reticulata*. *Bioresour. Technol.* 42 (1992), 141–148.

Arad S., Rapoport L., Moshkovich A., Van Moppes D., Karpasas M., Golan R., Golan Y., Superior biolubricant from a species of red microalga. *Langmuir* 22 (2006), 7313–7317.

Arad S., Weinstein Y., Novel lubricants from red microalgae: interplay between genes and products. *Biomed.* 1 (2003), 32–37.

Arad S.M., Friedman O.D., Rotem A., Effect of Nitrogen on Polysaccharide Production in a *Porphyridium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 (1988), 2411–2414.

Arad S.M., Levy-Ontman O., Red microalgal cell-wall polysaccharides: biotechnological aspects. *Curr. Opin. Biotech.* 21 (2010), 358–364.

Arad S.M., Yaron A., Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics. *Trends Food Sci. Tech.* 3 (1992), 92–97.

Ariyachet C., Solis N.V., Liu Y., Prasadarao N.V., Filler S.G., McBride A.E., SR-Like RNA-binding protein Slr1 affects *Candida albicans* filamentation and virulence. *Infect. Immun.* 81 (2013), 267–1276.

Azaman S., Nagao N., Yusoff F., Tan S., Yeap S., A comparison of the morphological and biochemical characteristics of *Chlorella sorokiniana* and *Chlorella zofingiensis* cultured under photoautotrophic and mixotrophic conditions. *Peer J.* 5 (2017), 3473.

B

Barbier G., Oesterhelt C., Larson M.D., Halgren R.G., Wilkerson C., Garavito R.M., Benning C., Weber A.P.M., Comparative genomics of two closely related unicellular thermoacidophilic red algae, *Galdieria sulphuraria* and *Cyanidioschyzon merolae*, reveals the molecular basis of the metabolic flexibility of *Galdieria sulphuraria* and significant differences in carbohydrate metabolism of both algae. *Plant Physiol.* 137 (2005), 460–474.

Bayona K.C.D., Gallón S.M.N., Estrada A.L., Rios J.C., Garces L.A., Martínez A.M., Activity of Sulfated Polysaccharides from Microalga *Porphyridium cruentum* over Degenerative Mechanisms of the Skin. *Int. J. Sci. Adv. Technol.* 2 (2012), 85–92.

Becker E.W., Micro-algae as a source of protein. *Biotechnol. Adv.* 25 (2007), 207–210.

Becker E.W., Microalgae: biotechnology and microbiology, Cambridge University Press, Cambridge, 1994.

Benavides J., Rito-Palomares M., Simplified two-stage method to B-phycoerythrin recovery from *Porphyridium cruentum*. *J. Chrom. B* 844 (2006), 39–44.

Bermejo R., Ación F.G., Ibáñez M.J., Fernández J.M., Molina E., Alvarez-Pez J.M., Preparative purification of B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum* by expanded-bed adsorption chromatography. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 790 (2003a), 317–325.

Bermejo R., Alvarez-Pez J.M., Fernandez A., Grima E.M., Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*, *J. Biotechnol.* 93 (2002), 73–85.

Bermejo R., Ruiz E., Acien F.G., Recovery of B-phycoerythrin using expanded bed adsorption chromatography: Scale-up of the process. *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007), 927–933.

Bermejo R., Talavera E.M., Alvarez-Pez J.M., Chromatographic purification and characterization of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. Semi preparative HPLC separation and characterization of its subunits. *J. Chromatogr.* 917 (2001), 135–145.

Bermejo R., Tobaruela D.J., Talavera E.M., Orte A., Alvarez-Pez J.M., Fluorescent behavior of B-phycoerythrin in microemulsions of aerosol OT/water/isooctane. *J. Colloid. Interface Sci.* 263 (2003b), 616–24.

Bhattacharya D., Price D.C., Chan C.X., Qiu H., Rose N., Ball S., Weber A.P.M., Arias M.C., Henrissat B., Coutinho P.M., Krishnan A., Zauner S., Morath S., Hilliou F., Egizi A., Perrineau M.M., Yoon H.S., Genome of the red alga *Porphyridium purpureum*. *Nat. Commun.* 4 (2013), 1941.

Bligh E.G., Dyer W.J., A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. biochem. physiol.* 37 (1959), 911–917.

Bollman R.C., Robinson G.G.C., The kinetics of organic acid uptake by three Chlorophyta in axenic culture. *J. Phycol.* 13 (1977), 1–5.

Borghi E., Morace G., Borgo F., Rajendran R., Sherry L., Nile C., Ramage G., New strategic insights into managing fungal biofilms. *Front. Microbial.* 6 (2015), 1077

Borowitzka M.A., Microalgae as sources of essential fatty acids. *Aust. J. Biotechnol.* 1 (1988), 58–62.

Boyle N., Morgan J., Flux balance analysis of primary metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *BMC Syst. Biol.* 3 (2009), 4.

Boyle N.R., Sengupta N., Morgan J.A., Metabolic flux analysis of heterotrophic growth in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plos one* 12 (2017), 1–23.

Brody M., Emerson R., The effect of wavelength and intensity of light on the proportion of pigments in *Porphyridium cruentum*. *Am. J. Bot.* 46 (1959), 433–440.

C

Cadoret J.P., Bernard O., La production de biocarburant lipidique avec des microalgues : promesses et défis. *La Société de Biologie* 202 (2008), 201–211.

Capek P., Matulová M., Combourieu B., The extracellular proteoglycan produced by *Rhodella grisea*. *Int. J. Biol. Macromol.* 43 (2008), 390–393.

Cawse P.A., The determination of nitrate in soil solutions by ultraviolet spectrometry. *Analyst.* 62 (1967), 311–315.

Chaloub R.M., Motta N.M.S., de Araujo S.P., de Aguiar P.F., da Silva A.F., Combined effects of irradiance, temperature and nitrate concentration on phycoerythrin content in the microalga *Rhodomonas sp.* (Cryptophyceae). *Algal Res.* 8 (2015), 89–94.

Cheirsilp B., Mandik Y., Prasertsan P., Evaluation of optimal conditions for cultivation of marine *Chlorella sp.* as potential sources of lipids, exopolymeric substances and pigments. *Aquacult. Int.* 24 (2016), 313–326.

Cheirsilp B., Torpee S., Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresour. Technol.* 110 (2012), 510–516.

Chen C., Chang H., Chang J., Producing carbohydrate-rich microalgal biomass grown under mixotrophic conditions as feedstock for biohydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energ.* 41 (2016), 4413–4420.

Chen C., Ho S., Liu C., Chang J., Enhancing lutein production with *Chlorella sorokiniana* Mb-1 by optimizing acetate and nitrate concentrations under mixotrophic growth. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 79 (2017), 88–96.

Chen D., Wu X.Z., Wen Z.Y., Sulfated polysaccharides and immune response: Promoter or inhibitor? *Panminerva Med.* 2008.

Chen F., Zhang Y., Guo S., Growth and phycocyanin formation of *Spirulina platensis* in photoheterotrophic culture. *Biotechnol. Lett.* 18 (1996), 603–608.

Chen F., Zhang Y., High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. *Enzyme Microb. Technol.* 20 (1997), 221–224.

Chinnasamy S., Ramakrishnan B., Bhatnagar A., Das K.C., Biomass Production Potential of a Wastewater Alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under Elevated Levels of CO₂ and Temperature. *Int. J. Mol. Sci.* 10 (2009), 518–532.

Chisti Y., Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25 (2007), 294–306.

Chisti Y., Large-Scale Production of Algal Biomass: Raceway Ponds. *Algae Biotechnol.* (2016), 21–40.

Chisti Y., Raceways-based production of algal crude oil, in: Posten C., Walter C. (Eds.), *Microalgal biotechnology: Potential and production*-de Gruyter, Berlin, 2012, pp. 113–146.

Chmit M., Kanaan H., Habib J., Abbass M., Mcheik A., Chokr A., Antibacterial and antibiofilm activities of polysaccharides, essential oil, and fatty oil extracted from *Laurus nobilis* growing in Lebanon Asian Pacific. *Asian Pac J. Trop. Med.* 7 (2014), 546–552.

Chokshi K., Pancha I., Trivedi K., George B., Maurya R., Ghosh A., Mishra S., Biofuel potential of the newly isolated microalgae *Acutodesmus dimorphus* under temperature induced oxidative stress conditions. *Bioresour. Technol.* 180 (2015), 162–171.

Cian R.E., Drago S.R., de Medina F.S., Martinez-Augustin O., Proteins and Carbohydrates from Red Seaweeds: Evidence for Beneficial Effects on Gut Function and Microbiota. *Mar. Drugs.* 13 (2015), 5358–5383.

Cobrado L., Silva-Dias A., Azevedo M.M., Pina-Vaz C., Rodrigues A.G., *In vivo* antibiofilm effect of cerium, chitosan and hamamelitannin against usual agents of catheter-related bloodstream infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 68 (2013) 126–130.

Cohen E., Arad S.M., A closed system for outdoor cultivation of *Porphyridium*. *Biomass* 18 (1989), 59–67.

Cohen Z., Norman H.A., Heimer Y.M., Microalgae as a source of omega-3 fatty acids. *World Rev. Nutr.* 77 (1995), 1–31.

Costa E., Silva S., Tavaría F., Pintado M., Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Chitosan on the Oral Pathogen *Candida albicans*. *Pathogens*. 3 (2014), 908–919.

D

Da Silva A.F., Lourenço S.O., Chaloub R.M., Effects of nitrogen starvation on the photosynthetic physiology of a tropical marine microalga *Rhodomonas sp.* (Cryptophyceae). *Aquat. Bot.* 91 (2009), 291–297.

Dandamudi K., Muppaneni T., Sudasinghe N., Schaub T., Holguin F., Lammers P., Deng S., Co-liquefaction of mixed culture microalgal strains under sub-critical water conditions. *Bioresour. Technol.* 236 (2017), 129–137.

Das P., Lei W., Aziz S., Obbard J., Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light. *Bioresour. Technol.* 102 (2011), 3883–3887.

de Jesus Raposo M.F., de Morais A.M., de Morais R.M., Influence of sulphate on the composition and antibacterial and antiviral properties of the exopolysaccharide from *Porphyridium cruentum*. *Life Sc.* 101 (2014), 56–63.

de Jesus Raposo M.F., de Morais A.M., de Morais R.M., Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications. *Mar. drugs* 13 (2015), 2967–3028.

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

De-Bashan L.E., Trejo A., Huss V.A.R., Hernandez J.P., Bashan Y., *Chlorella sorokiniana* UTEX 2805, a heat and intense, sunlight-tolerant microalga with potential for removing ammonium from wastewater. *Bioresour. Technol.* 99 (2008), 4980–4989.

Delattre C., Pierre G., Laroche C., Michaud P., Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. *Biotechnol. Adv.* 34 (2016), 1159–1179.

Dillon H.F., Somanchi A., Rao K., Methods and compositions for cholesterol reduction in mammals, US 20070167398A1, **2006**.

Dillon H.F., Zaman A., Day A.G., Coragliotti A., Microalgae-derived compositions for improving the health and appearance of skin, US20150140051A1, **2014**.

Dixon P.S., Morphology, in: Oliver Boyd (Eds.), *Biology of the Rhodophyta*, Edinburgh, Scotland, **1973**, pp. 45.

Dodgson K.S., Price R.G., A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochem. J.* 84 (**1962**), 106–110.

Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F., Colorimetric method for determination of sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 28 (**1956**), 350–356.

Ducret A., Sidler W., Frank G., Zuber H., The complete amino acid sequence of R-phycoerythrin- α and β subunits from the red alga *Porphyridium cruentum*. *Eur. J. Biochem.* 221 (**1994**), 563–580.

Dupré C., Guary J.C., Grizeau D., Effect of photon fluence rate, nitrogen limitation and nitrogen recovery on the level of phycoerythrin in the unicellular alga *Rhodorus marinus* (Rhodophyceae). *Physiol. Plant.* 92 (**1994**), 521–527.

Dvir I., Chayoth R., Sod-Moriah U., Shany S., Nyska A., Stark A.H., Madar Z., Arad S.M., Soluble polysaccharide and biomass of red microalga *Porphyridium* sp. alter intestinal morphology and reduce serum cholesterol in rats. *Br. J. Nutr.* 84 (**2000**), 469–476.

E

Evans L.V., Electron microscopical observations on a new red algal unicell, *Rhodella maculata* gen. nov., sp. nov. *Br. Phycol. J.* 5 (**1970**), 1–13.

Evans L.V., Maureen E., Studies on the synthesis and composition of extracellular mucilage in the unicellular red alga *Rhodella*. *J. Cell Sci.* 16 (**1974**), 1–21.

F

Fabregas J., Garcia D., Fernandez-Alonso M., Rocha A.I., Gomez-Puertas P., Escribano J.M., Otero A., Coll J., In vitro inhibition of the replication of haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) and African swine fever virus (ASFV) by extracts from marine microalgae. *Antivir. Res.* 44 (1999b), 67–73.

Fabregas J., García D., Lamela T., Otero A., Mixotrophic production of phycoerythrin and exopolysaccharide by the microalga *P.cruentum*. *Crypto. Algal.* 20 (1999a), 89–94.

Farges B., Laroche C., Cornet J.F., Dussap C.G., Spectral kinetic modeling and long-term behaviour assessment of *Arthrospira platensis* growth in photobioreactor under red (620nm) light illumination. *Biotechnol. Prog.* 25 (2009), 151–162.

Fisher M., Gokhman I., PickU., Zamir A., A Salt-resistant Plasma Membrane Carbonic Anhydrase Is Induced by Salt in *Dunaliella salina*. *J. Biol. Chem.* 271 (1996), 17718–17723.

Fuentes M.M.R., Fernandez G.G.A., Pérez J.A.S., Guerrero J.L.G., Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. *Food Chem.* 70 (2000), 345–353.

Fuentes M.M.R., Sánchez J.L.G., Sevilla J.M.F., Fernández F.G.A., Pérez J.A.S., Grima E.M., Outdoor continuous culture of *Porphyridium cruentum* in a tubular photobioreactor: quantitative analysis of the daily cyclic variation of culture parameters. *J. Biotechnol.* 70 (1999), 271–288.

G

Gaignard C., Gargouch N., Dubessay P., Delattre C., Pierre G., Laroche C., Fendri I., Abdelkafi S., Michaud P., New Horizons in Culture and Valorization of Red Microalgae, *Biotechnol. Adv.* 37 (2019), 193–222.

Gaignard C., Macao V., Gardarin C., Picton L., Rihouey C., Michaud P., Laroche C., The red microalga *Flintiella sanguinaria* as a new exopolysaccharide producer. *J. Appl. Phycol.* (2018), 1–12.

Galvan A., Fernández E., Eukaryotic nitrate and nitrite transporters. *Cell. Mol. Life Sci.* 58 (2001), 225–233.

Gantt E., Conti S.F., The ultrastructure of *Porphyridium cruentum*. *J. Cell Biol.* 26 (1965), 365–381.

Gardeva E., Toshkova R., Minkova K., Gigova L., Cancer Protective Action of Polysaccharide, Derived from Red Microalga *Porphyridium Cruentum* A Biological Background. *Biotechnol. Biotech. Eq.* (2009), 783–787.

Gardian Z., Bumber L., Schrofel A., Herbstova M., Nebesarova J., Vacha F., Organisation of photosystem I and photosystem II in red alga *Cyanidium caldarium*: Encounter of cyanobacterial and higher plant concept. *Biochim. Biophys. Acta. Bioenerg.* 1767 (2007), 725–731.

Gee C., Niyogi K., The carbonic anhydrase CAH1 is an essential component of the carbon-concentrating mechanism in *Nannochloropsis oceanica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 114 (2017), 4537–4542.

George B., Pancha I., Desai C., Chokshi K., Paliwal C., Ghosh T., Mishra S., Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus*—a potential strain for biofuel production. *Bioresour. Technol.* 171 (2014), 367–374.

Geresh S., Arad S., Shefer A., Chemically crosslinked polysaccharide of the red microalga *Rhodella reticulata*-an ion exchanger for toxic metal ions. *J. Carbohydr. Chem.* 16 (1997), 703–708.

Geresh S., Arad S., The extracellular polysaccharides of the red microalgae: Chemistry and rheology. *Bioresour. Technol.* 38 (1991), 195–201.

Geresh S., Arad S.M., Levy-Ontman O., Zhang W., Isolation and characterization of poly- and oligosaccharides from the red microalga *Porphyridium sp.* *Carbohydr. Res.* 344 (2009), 343–349.

Geresh S., Dubinsky O., Arad S.M., Christiaen D., Structure of a 3-O-(α -D-glucopyranosyluronic acid)-L-galactopyranose, an aldobiouronic acid isolated from the polysaccharides of various unicellular red algae. *Carbohydr. Res.* 208 (1990), 301–305.

Geresh S., Lupescu N., Arad S.M., Fractionation and partial characterization of the sulphated polysaccharide of *Porphyridium*. *Phytochemistry*. 31 (1992), 4181–4186.

Geresh S., Mamontov A., Weinstein J., Sulfation of extracellular polysaccharides of red microalgae: preparation, characterization and properties. *J. Biochem. Bioph. Meth.* 50 (2002), 179–187.

Gerlach J.T., Diepolder H.M., Zachoval R., Gruener N.H., Jung M.C., Ulsenheimer A., Schraut W.W., Schirren C.A., Waechtler M., Backmund M., Pape G.R., Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. *Gastroenterology* 125 (2003), 80–88.

Ginzberg A., Cohen M., Sod-Moriah U.A., Shany S., Rosenshtrauch A., Arad S.M., Chickens fed with biomass of the red microalga *Porphyridium* sp. have reduced blood cholesterol level and modified fatty acid composition in egg yolk. *J. Appl. Phycol.* 12 (2000), 325–330.

Glazer A.N., Light harvesting by phycobilisomes. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 14 (1985), 47.

Glazer A.N., Phycobiliproteins – a family of valuable, widely used fluorophores. *J. Appl. Phycol.* 6 (1994), 105–112.

Glazer A.N., Stryer L., Phycofluor probes. *Trends Biochem. Sci.* 9 (1984), 423–427.

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

Gobler C.J., Berry D.L., Dyhrman S.T., Wilhelm S.W., Salamov A., Lobanov A.V., Zhang Y., Collier J.L., Wurch L.L., Kustka A.B., Dill A.D., Shah M., VerBerkmoes N.C., Kuo A., Terry A., Pangilinan J., Lindquist E.A., Lucas S., Paulsen I.T., Hattenrath-Lehmann T.K., Talmage S.C., Walker E.A., Koch F., Burson A.M., Marcoval M.A., Tang Y.Z., LeClerc G.R., Coyne K.J., Berg G.M., Bertrand E.M., Saito M.A., Gladyshev V.N., Grigoriev I.V., Niche of harmful alga *Aureococcus anophagefferens* revealed through ecogenomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108 (2011), 4352–4357.

Godos I., Mendoza J.L., Ación F.G., Molina E., Banks C.J., Heaven S., Rogalla F., Evaluation of carbon dioxide mass transfer in raceway reactors for microalgae culture using flue gases. *Bioresour. Technol.* 153 (2014), 307–314.

Gómez-Ordóñez E., Rupérez P., FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds. *Food Hydrocoll.* 25 (2011), 1514–1520.

Gross W., Schnarrenberger C., Heterotrophic growth of two strains of the acido-thermophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Plant Cell. Physiol.* 36 (1995), 633–638.

Guedes A.C., Amaro H.M., Malcata F.X., Microalgae as sources of carotenoids. *Mar. Drugs* 9 (2011), 625–644.

Guiry M., How many species of algae are there? *J. Phycol.* 48 (2012), 1057–1063.

Guzmán-Murillo M.A., Ascencio F., Anti-adhesive activity of sulphated exopolysaccharides of microalgae on attachment of the red sore disease-associated bacteria and *Helicobacter pylori* to tissue culture cells. *Lett. Appl. Microbiol.* 30 (2000) 473–478.

H

Harun R., Singh M., Forde G.M., Danquah M.K., Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable Sustainable Energy Rev.* 14 (2010), 1037–1047.

Hasui M., Matsuda M., Okutani K., Shigeta S., In vitro antiviral activities of sulfated polysaccharides from a marine microalga (*Cochlodinium polykrikoides*) against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. *Int. J. Biol. Macromol.* 17 (1995), 293–297.

Hazra B., Biswas S., Mandal N., Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. *BMC Complement Altern. Med.* 8 (2008), 63.

He F., Yang Y., Yang G., Yu L., Studies on antibacterial activity and antibacterial mechanism of a novel polysaccharide from *Streptomyces virginia* H03. *Food Control* 21 (2010), 1257–1262.

Hemlata, Afreen S., Fatma T., Extraction, purification and characterization of phycoerythrin from *Microchaete* and its biological activities. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 13 (2018), 84–89.

Hirabaru C., Izumo A., Fujiwara S., Tadokoro Y., Shimonaga T., Konishi M., Yoshida M., Fujita N., Nakamura Y., Yoshida M., Kuroiwa T., Tsuzuki M., The primitive rhodophyte *Cyanidioschyzon merolae* contains a semiamylopectin-type, but not an amylose-type, alpha-glucan. *Plant Cell Physiol.* 51 (2010), 682–693.

Hirabayashi S., Prillutsky A., Sadamatsu H., Method of culturing algae capable of producing phototrophic pigments, highly unsaturated fatty acids, or polysaccharides at high concentration, US6579714B1, 1999.

Ho S.H., Chen C.Y., Chang J.S., Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresour. Technol.* 113 (2013), 244–252.

Hong S.J., Lee C.G., Evaluation of central metabolism based on a genomic database of *Synechocystis* PCC6803. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 12 (2007), 165–173.

Hu Q., Environmental effects on cell composition, in: Richmond A. (Eds.), Handbook of microalgal culture, Biotechnology and Applied Phycology, Blackwell Publishing, Oxford, 2005, pp. 83–93.

Huang C., Miao M., Janaswamy S., Hamaker B.R., Li X., Jiang B., Polysaccharide Modification through Green Technology: Role of Endodextranase in Improving the Physicochemical Properties of (1→3)(1→6)- α -D-Glucan. *J. Agric. Food Chem.* 63 (2015), 6450–6456.

Huang L., Shen M., Zhang X., Jiang L., Song Q., Xie J., Effect of high-pressure microfluidization treatment on the physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharide from *Mesona chinensis* Benth. *Carbohydr. Polym.* 200 (2018), 191–199.

Huleihel M., Ishanu V., Tal J., Arad S.M., Antiviral effect of red microalgal polysaccharides on Herpes simplex and Varicella zoster viruses. *J. Appl. Phycol.* 13 (2001), 127–134.

Hussain F., Shah S.Z., Zhou W., Iqbal M., Microalgae screening under CO₂ stress: Growth and micro-nutrients removal efficiency. *J. Photochem. Photobiol. B.* 170 (2017), 91–98.

I

Iglesias-rodriguez M.D., Merrett M.J., Dissolved inorganic carbon utilization and the development of extracellular carbonic anhydrase by the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *New Phytol.* 135 (1997), 163–168.

Ivanova J.G., Kabaivanova L.V., Petro P.D., Yankova S.N., Optimization strategies for improved growth, polysaccharide production and storage of the red microalga *Rhodella reticulata*. *Bulg. Chem. Commun.* 47 (2015), 167–174.

J

Jahn W., Steinbiss J., Zetsche K., Light intensity adaptation of the phycobiliprotein content of the red alga *Porphyridium*. *Planta* 161 (1984), 536–539.

Jeffrey S.W., Wright S.W., Zapata M., Microalgal classes and their signature pigments, in : Roy S., Llewellyn C., Egeland E.S., Johnsen G. (Eds.), *Phytoplankton pigments Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography*, Cambridge university press, New York, 2011.

Jiao G., Yu G., Zhang J., Ewart H.S. Chemical structures and bioactivities of sulphated polysaccharides from marine algae. *Mar. Drugs* 9 (2011), 196–223.

Jubeau S., Marchal L., Pruvost J., Jaouen P., Legrand J., Fleurence J., High pressure disruption: a two-step treatment for selective extraction of intracellular components from the microalga *Porphyridium cruentum*. *J. Appl. Phycol.* 25 (2013), 983–989.

Juneja A., Ceballos R.M., Murthy G.S., Effects of Environmental Factors and Nutrient Availability on the Biochemical Composition of Algae for Biofuels Production: A Review. *Energies* 6 (2013), 4607–4638.

K

Kačuráková M., Capek P., Sasinkova V., Wellner N., Ebringerova A., FT-IR study of plant cell wall model compounds: Pecticpolysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydr. Polym.* 43, (2000) 195–203.

Karkouch I., Tabbene O., Gharbi D., Ben Mlouka M.A., Elkahoui S., Rihouey C., Coquet L., Cosette P., Jouenne T., Limam F., Antioxidant, antityrosinase and antibiofilm activities of synthesized peptides derived from *Vicia faba* protein hydrolysate: A powerful agents in cosmetic application. *Ind. Crops Prod.* 109 (2017), 310–319.

Kathiresan S., Sarada R., Bhattacharya S., Ravishankar G.A., Culture media optimization for growth and phycoerythrin production from *Porphyridium purpureum*. *Biotechnol. Bioeng.* 96 (2007), 456–463.

Kavitha M.D., Kathiresan S., Bhattacharya S., Sarada R., Culture media optimization of *Porphyridium purpureum*: production potential of biomass, total lipids, Arachidonic and eicosapentaenoic acid. *J. Food Sci. Technol.* 53 (2016), 2270–2278.

Kesraoui O., Marzouki M.N., Maugard T., Limam F., In vitro evaluation of antioxidant activities of free and bound phenolic compounds from *Posidonia oceanica* (L.) Delile leaves. *Afr. J. Biotechnol.* 10 (2011), 3176–3185.

Kim H.M., Oh C.H., Bae H.J., Comparison of red microalgae (*Porphyridium cruentum*) culture conditions for bioethanol production. *Bioresour. Technol.* 233 (2017), 44–50.

Kim M., Yim J.H., Kim S.Y., Kim H.S., Lee W.G., Kim S.J., Kang P.S., Lee C.K., In vitro inhibition of influenza A virus infection by marine microalga-derived sulfated polysaccharide p-KG03. *Antivir. Res.* 93 (2012), 253–259.

Kivelä R., Pitkänen L., Laine P., Aseyev V., Sontag-Strohm T., Influence of homogenisation on the solution properties of oat β -glucan. *Food Hydrocolloid.* 24 (2010) 611–618.

Kovač D., Babić O., Milovanović I., Mišan A., Simeunović J., The production of biomass and phycobiliprotein pigments in filamentous cyanobacteria: the impact of light and carbon sources. *Appl. Biochem. Micro.* 53 (2017), 539–545.

Kraft G.T., Woelkerling W.J., Rhodophyta-systematics and biology, in: Clayton M.N., King R.J. (Eds.), *Biology of marine plants*, Melbourne: Longman Cheshire, 1990, pp. 41–85.

Kris-Etherton P.M., Grieger J.A., Etherton T.D., Dietary reference intakes for DHA and EPA. Prostaglandins, Leukot. Essent. *Fatty Acids* 81 (2009), 99–104.

Kröger M., Müller-Langer F., Impact of heterotrophic and mixotrophic growth of microalgae on the production of future biofuels. *Biofuels* 2 (2011), 145–151.

Kylin H., Übereine marine Porphyridium-Art. Kungl. FysiografiskaSällskapetetsi Lund Förhandlingar. 7 (1937), 119–123.

ℒ

Laemmli U.K., Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 5 (1970), 227–680.

Lamers P.P., Janssen M., De Vos R.C.H., Bino R.J., Wijffels R.H., Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular green microalga. *J. Biotechnol.* 162 (2012), 21–27.

Larkum A.W., Photosynthesis and Light Harvesting in Algae, in: Borowitzka M.A., Beardall J., Raven J.A. (Eds.), *The Physiology of Microalgae*, Springer International Publishing, Switzerland, 2016, pp. 67–87.

Latasa M., Berdalet E., Effect of nitrogen or phosphorus starvation on pigment composition of cultured *Heterocapsa* sp. *J. Plankton Res.* 16 (1994), 83–94.

Lavanchy D., Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J. Viral Hepat.* 11 (2004), 97–107.

Lee E., Jalalizadeh M., Zhang Q., Growth kinetic models for microalgae cultivation: A review, *Algal Res.* 12 (2015), 497–512.

Lee Y., Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. *J. Appl. Phycol.* 13 (2001), 307–315.

Lehninger A.L., Nelson D.L., Cox M.M., *Lehninger Principles of biochemistry*, Fourth ed., W.H. Freeman and company, New York, 2005.

Levy L., Gant E., Development of photosynthetic activity in *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta) following nitrogen starvation. *J. Phycol.* 26 (1990), 62–68.

Leyva L.A., Bashan Y., Mendoza A., de-Bashan L.E., Accumulation of fatty acids in *Chlorella vulgaris* under heterotrophic conditions in relation to activity of acetyl-CoA

carboxylase, temperature, and co-immobilization with *Azospirillum brasilense*. *Naturwissenschaften* 101 (2014), 819–830.

Li H., Li Z., Xiong S., Zhang H., Li N., Zhou S., Liu Y., Huang Z., Pilot-scale isolation of bioactive extracellular polymeric substances from cell-free media of mass microalgal cultures using tangential-flow ultrafiltration. *Process Biochem.* 46 (2011), 1104–1109.

Li Q.Y., Gao X.S., Sun Y., Zhang Q.Q., Song R.T., Xu Z.K., Isolation and characterization of a sodium-dependent phosphate transporter gene in *Dunaliella viridis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340 (2006), 95–104.

Li S.H., Xia B.B., Zhang C., Cao J., Bai L.H., Cloning and characterization of a phosphate transporter gene in *Dunaliella salina*. *J. Basic Microbiol.* 52 (2012), 429–436.

Li X., Xu H., Wu Q., Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 98 (2007), 764–771.

Liang Y., Producing liquid transportation fuels from heterotrophic microalgae. *Appl. Energy* 104 (2013), 860–868.

Liang Y., Sarkany N., Cui Y., Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol. Lett.* 31 (2009), 1043–1049.

Lichtenthaler H., Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* 148 (1987), 350–382.

Lin Q., Gu N., Lin J., Effect of ferric ion on nitrogen consumption, biomass and oil accumulation of a *Scenedesmus rubescens*-like microalga. *Bioresour. Technol.* 112 (2012), 242–247.

Liqin S., Wang C., Lei S., Effects of Light Regime on Extracellular Polysaccharide Production by *Porphyridium Cruentum* Cultured in Flat Plate Photobioreactors. *Int. Conf. Bioinf. Biomed. Eng. 2nd.* (2008), 1488–1491.

Liu H., Fang H.P., Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *J. Biotechnol.* 95 (2002), 249–256.

- Liu L., Zhao Y., Jiang X., Wang X., Liang W., Lipid accumulation of *Chlorella pyrenoidosa* under mixotrophic cultivation using acetate and ammonium. *Bioresour. Technol.* 262 (2018), 342–346.
- Llewellyn C.A., Egeland E.S., Johnsen G., Phytoplankton Pigments: Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography, in: Roy S. (Eds.), Published by Cambridge University Press, Scientific Committee on Oceanic Research (SCOR), 2011.
- López C.G., García M., Fernández F., Bustos C., Chisti Y., Sevilla J., Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresour. Technol.* 101 (2010), 7587–7591.
- Lourenço S.O., Barbarino E., Mancini-Filho J., Schinke K.P., Aidar E., Effects of different nitrogen sources on the growth and biochemical profile of 10 marine microalgae in batch culture: an evaluation for aquaculture. *Phycologia* 41 (2002), 158–168.
- Lowrey J., Brooks M., McGinn P., Heterotrophic and mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production in agricultural wastewaters and associated challenges—a critical review. *J. Appl. Phycol.* 27 (2015), 1485–1498.
- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1951), 265.
- Lutzu G.A., Zhang L., Zhang Z., Liu T., Feasibility of attached cultivation for polysaccharides production by *Porphyridium cruentum*. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 40 (2017), 73–83.

M

- Manirafasha E., Ndikubwimana T., Zeng X., Lu Y., Jing K., Phycobiliprotein: Potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. *Biochem. Eng. J.* 109 (2016), 282–296.
- Manrique G.D., Lajolo F.M., FT-IR spectroscopy as a tool for measuring degree of methyl esterification in pectins isolated from ripening papaya fruit. *Postharvest Biol. Tech.* 25 (2002), 99–107.

Marcati A., Ursu A.V., Laroche C., Soanen N., Marchal L., Jubeau S., Djelveh G., Michaud P., Extraction and fractionation of polysaccharides and B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum* by membrane technology, *Algal Res.* 5 (2014), 258–263.

Maréchal Y., Interaction configurations of H₂O molecules in a protein (Stratum Corneum) by infrared spectrometry. *J. Mol. Struct.* 416 (1997), 133–143.

Marquardt J., Effects of carotenoid-depletion on the photosynthetic apparatus of a *Galdieria sulphuraria* (Rhodophyta) strain that retains its photosynthetic apparatus in the dark. *J. Plant Physiol.* 152 (1998), 372–380.

Marquardt J., Rehm A.M., *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta) from red and green light: characterization of photosystem I and determination of in situ fluorescence spectra of the photosystems. *J. Photochem. Photobiol. Biology.* 30 (1995), 49–56.

Marquez F.J., Sasaki K., Kakizono T., Nishio N., Nagai S., Growth characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions. *J. Ferm. Bioeng.* 76 (1993), 408–410.

Martinez L.R., Mihi M.R., Tar M., Cordero R.J., Han G., Friedman A.J., Friedman J.M., Nosanchuk J.D., Demonstration of antibiofilm and antifungal efficacy of chitosan against candidal biofilms, using an in vivo central venous catheter model. *J. Infect. Dis.* 201 (2010), 1436–1440.

Martinez M.J.A., Del Olmo L.M.B., Benito P.B., Antiviral activities of polysaccharides from natural sources. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 30 (2005), 393–418.

Masojídek J., Torzillo G., Koblížek M., Photosynthesis in Microalgae, in: Richmond A., Hu Q., (Eds.), *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*, Second Edition, 2013.

Matsui S.M., Muizzudin N., Arad S.M., Marenus K., Sulfated polysaccharides from red microalgae anti-inflammatory properties *in vitro* and *in vivo*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 104 (2003), 13–22.

McCracken D.A., Cain J.R., Amylose in floridean starch. *New Phytol.* 88 (1981), 67–71.

McNeill J., Barrie F.R., Buck W.R., Demoulin V., Greuter W., Hawksworth D.L., Herendeen P.S., Knapp S., Marhold K., Prado J., Prud'homme van Reine W.F., Smith G.F., Wiersma J.H., Turland N.J., International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code) adopted by the Eighteenth International Botanical Congress Melbourne, **2011**.

Mihova S.G., Georgiev D.I., Minkov K.M., Phycobiliproteins in *Rhodella reticulata* and photoregulatory effects on their content. *J. Biotechnol.* 48 (**1996**), 251–257.

Mihova S.G., Minkova K.M., Petkov G.D., Georgiev D.I., Thermal and photoregulation of the lipid and fatty acid content in the cells of *Porphyridium sordidum*, Comptes rendus de l'académie bulgare des sciences: sciences mathématiques et naturelles. 50 (**1997**), 111–114.

Miller S.R., Castenholtz R.W., Ecological Physiology of *Synechococcus* sp. Strain SH-94-5, a Naturally Occurring Cyanobacterium Deficient in Nitrate Assimilation. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (**2001**), 3002–3009.

Monsoor M.A., Kalapathy U., Proctor A., Determination of polygalacturonic acid content in pectin extracts by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chem.* 74 (**2001**), 233–238.

Montreuil J., Spik G., Chosson A., Segard E., Scheppler N., Methods of study of the structure of glycoproteins. *J. Pharm. Belg.* 18 (**1963**), 529–546.

Morales-Sánchez D., Tinoco R., Kyndt J., Martínez A., Heterotrophic growth of *Neochloris oleoabundans* using glucose as a carbon source. *Biotechnol. Biofuels* 6 (**2013**), 1–12.

Moriyama T., Mori N., Sato N., Activation of oxidative carbon metabolism by nutritional enrichment by photosynthesis and exogenous organic compounds in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*: evidence for heterotrophic growth. *Springer Plus* 4 (**2015**), 559.

Moroney J.V., Ruby A., Ynalvez R.A., Proposed Carbon Dioxide Concentrating Mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot. Cell* 6 (**2007**), 1251–1259.

Morot-Gaudry J.F., Assimilation de l'azote chez les plantes: aspects physiologique, biochimique et moléculaire, INRA., **1997**, pp. 1–422.

Munier M., Jubeau S., Wijaya A., Morançais M., Dumay J., Marchal L., Jaouen P., Fleurence J., Physicochemical factors affecting the stability of two pigments: R-phycoerythrin of *Grateloupia turuturu* and B-phycoerythrin of *Porphyridium cruentum*. *Food Chem.* 150 (2014), 400–407.

Munier M., Morançais M., Dumay J., Jaouen P., Fleurence J., One-step purification of R-phycoerythrin from the red edible seaweed *Grateloupia turuturu*. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 15 (2015), 23–29.

Murugan T., Radhamadhavan, Screening for Antifungal and Antiviral activity of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis*. *J. Pharm. Res.* 4 (2011), 4161–4163.

Murugan T., Screening for Antifungal and Antiviral activity of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis*, 2011.

N

Naval J., Antia B., Berland R., Bonin D.J., Maestrini S.Y., Effects of urea concentration in supporting growth of certain marine microplanktonic algae. *Phycologia* 16 (1977), 105–111.

Neilson A.H., Lewin R.A., The uptake and utilization of organic carbon by algae: an essay in comparative biochemistry. *Phycologia* 13 (1974), 227–264.

Nimer N.A., Merrett M.J., Brownlee C., Inorganic carbon transport in relation to culture age and inorganic carbon concentration in a high-calcifying strain of *emiliana huxleyi* (prymnesiophyceae). *J. Phycol.* 32 (1996), 813–818.

Nosálová G., Capek P., Matáková T., Nosál S., Flešková D., Jureček L., Antitussive activity of an extracellular *Rhodella Grisea* proteoglycan on the mechanically induced cough reflex. *Carbohydr. Polym.* 87 (2012), 752–756.

Nzayisenga J., Eriksson K., Sellstedt A., Mixotrophic and heterotrophic production of lipids and carbohydrates by a locally isolated microalga using wastewater as a growth medium. *Bioresour. Technol.* 257 (2018), 260–265.

O

Oesterhelt C., Schnarrenberger C., Gross W., Characterization of a sugar/polyol-uptake system in the red alga *Galdieria sulphuraria*. *Eur. J. Phycol.* 34 (1999), 271–277.

Oh S.H., Han J.G., Kim Y., Ha J.H., Kim S.S., Jeong M.H., Jeong H.S., Kim N.Y., Cho J.S., Yoon W.B., Lee S.Y., Kang D.H., Lee H.Y., Lipid production in *Porphyridium cruentum* grown under different culture conditions. *J. Biosci. Bioeng.* 108 (2009), 429–434.

Ono E., Cuello J.L., Selection of optimal microalgae species for CO₂ sequestration. *Proceedings of Second Annual Conference on Carbon Sequestration.* 2003.

Osborn H.T., Akoh C.C., Structured lipids novel fats with medical, nutraceutical, and food applications. *Compr. Rev. Food Sci. F.* 3 (2002), 110–120.

P

Pan Q., Chen M., Li J., Wu Y., Zhen C., Liang B., Antitumor function and mechanism of phycoerythrin from *Porphyra haitanensis*. *Biol. Res.* 46 (2013), 87–95.

Pangestuti R., Kim S., Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. *J. Funct. Foods* 3 (2011), 255–266.

Park K., Whitney C., McNichol J., Dickinson K., MacQuarrie S., Skrupski B.P., Zou J., Wilson K.E., O’Leary S.J.B., McGinn P.J., Mixotrophic and photoautotrophic cultivation of 14 microalgae isolates from Saskatchewan, Canada: potential applications for wastewater remediation for biofuel production. *J. Appl. Phycol.* 24 (2012), 339–348.

Patel A.K., Laroche C., Marcati A., Ursu A.V., Jubeau S., Marchal L., Petit E., Djelveh G., Michaud P., Separation and fractionation of exopolysaccharides from *Porphyridium cruentum*. *Bioresour. Technol.* 145 (2013), 345–350.

Patel S.N., Sonani R.R., Jakharia K., Bhastana B., Patel H.M., Chaubey M.G., Singh N.K., Madamwar D., Antioxidant activity and associated structural attributes of *Halomicronema* phycoerythrin. *Int. J. Biol. Macromol.* 111 (2018), 359–369.

Pengzhan Y., Ning L., Xiguang L., Gefei Z., Quanbin Z., Pengcheng L., Antihyperlipidemic effects of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Pharmacol. Res.* 48 (2003), 543–549.

Pérez R., Ces algues qui nous entourent, in: Arbault S., Barbaroux O., Phliponeau P., Rouxel C. (Eds.), France, Plouzané, Editions IFREMER, 1997, pp. 272.

Perez-Garcia O., Bashan Y., Microalgal Heterotrophic and Mixotrophic Culturing for Bio-refining: From Metabolic Routes to Techno-economics. in: Prokop A., Bajpai R., Zappi M. (Eds.), Algal Biorefineries. Springer, Cham, 2015.

Perez-Garcia O., Escalante F., de-Bashan L., Bashan Y., Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Res.* 45 (2011), 11–36.

Petera B., Delattre C., Pierre G., Wadouachi A., Elboutachfaiti R., Engel E., Poughon L., Michaud P., Fenoradosoa T.A., Characterization of arabinogalactan-rich mucilage from *Cereus triangularis* cladodes. *Carbohydr. Polym.* 127 (2015), 372–380.

Pierre G., Sopena V., Juin C., Mastouri A., Graber M., Maugard T., Antibacterial activity of a sulfated galactan extracted from the marine alga *Chaetomorpha aerea* against *Staphylococcus aureus*. *Biotechnol. Bioproc. E.* 16 (2011), 937–945.

Pignolet O., Jubeau S., Vaca-Garcia C., Michaud P., Highly valuable microalgae: biochemical and topological aspects. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40 (2013), 781–796.

Pownall T.L., Udenigwe C.C., Aluko R.E., Effects of cationic property on the in vitro antioxidant activities of pea protein hydrolysate fractions. *Food Res. Int.* 44 (2011), 1069–1074.

Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A., Microbiologie (2è édition française). De Boeck université, 2003, pp. 1–1137.

R

Rahaoui A., Écophysiologie de *Rhodella violacea* (Rhodophyta) : production et propriétés structurales des exopolysaccharides et de l'amidon floridéen. PhD thesis, Université des Sciences et Technologies de Lille, 1999, pp. 1–130.

Raines C.A., Increasing Photosynthetic Carbon Assimilation in C3 Plants to Improve Crop Yield: Current and Future Strategies. *Plant Physiol.* 155 (2011), 36–42.

Raines S.M., Rane H.S., Bernardo S.M., Binder J.L., Lee S.A., Parra K.J., Deletion of vacuolar proton translocating ATPase voa isoforms clarifies the role of vacuolar pH as a determinant of virulence-associated traits in *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* 288 (2013), 6190–6201.

Ramage G., VandeWalle K., Lopez-Ribot J.L., Wickes B.L., The filamentation pathway controlled by theEfg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 214 (2002), 95–100.

Ramaraj R., Tsai D.D.W., Chen P.H., Chlorophyll is not Accurate Measurement for Algal Biomass. *Chiang Mai J. Sci.* 40 (2013), 547–555.

Ramus J., The capture and transduction of light energy, in: Lobban C.S., Wynne M.J. (Eds.), *The biology of seaweeds*. Blackwell Scientific Publications, Boston, 1981, pp. 458–492.

Ramus J., The production of extracellular polysaccharide by unicellular red alga *Porphyridium aerugineum*. *J. Phycol.* 8 (1972), 97–111.

Ras M., Steyer J.P., Bernard O., Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 12 (2013), 153–164.

Ratledge C., Kanagachandran K., Anderson A.J., Grantham D.J., Stephenson J.C., Production of docosahexaenoic acid by *Cryptocodinium cohnii* grown in a pH-auxostat culture with acetic acid as principal carbon source. *Lipids* 36 (2001), 1241–1246.

Raven J.A., Giordano M., Combined Nitrogen, in: Borowitzka M., Beardall J., Raven J. (Eds.), *The Physiology of Microalgae*, Developments in Applied Phycology, Springer, 2016.

Read B.A., Kegel J., Klute M.J., Kuo A., Lefebvre S.C., Maumus F., Mayer C., Miller J., Monier A., Salamov A., Young J., Aguilar M., Claverie J.M., Frickenhaus S., Gonzalez K., Herman E.K., Lin Y.C., Napier J., Ogata H., Sarno A.F., Shmutz J., Schroeder D., de Vargas C., Verret F., von Dassow P., Valentin K., Van de Peer Y., Wheeler G., Dacks J.B., Delwiche C.F., Dyhrman S.T., Glockner G., John U., Richards T., Worden A.Z., Zhang X.Y., Grigoriev I.V., Pan genome of the phytoplankton *Emiliana underpins* its global distribution. *Nature* 499 (2013), 209–213.

Richa K.V.K., Kesheri M., Singh G., Sinha R.P., Biotechnological potentials of phycobiliproteins. *Int. J. Pharma. Biosci.* 2 (2011), 446–454.

Rigano C., Studies on nitrate reductase from *Cyanidium caldarium*. *Arch. Mikrobiol.* 76 (1971), 265–276.

Rigano C., Violante U., Effect of heat treatment on the activity in vitro of nitrate reductase from *Cyanidium caldarium*. *Biochim. Biophys. Acta.* 256 (1972), 524–532.

Rigobello-Masini M., Aidar E., Masini J., Extra and intracellular activities of carbonic anhydrase of the marine microalga *Tetraselmis gracilis* (Chlorophyta). *Braz. J. Microbiol.* 34 (2003), 267–272.

Ritz M., Thomas J.C., Spilar A., Etienne A.L., Kinetics of photoacclimatation in response to a shift to high light irradiance of the red algae *Rhodella violacea* adapted to low irradiance. *Plant Physiol.* 123 (2000), 1415–1425.

Robu S., Aprotosoai A.C., Miron A., Cioancă O., Stănescu U., Hăncianu M., In vitro antioxidant activity of ethanolic extracts from some *lavandula* species cultivated in Romania. *Farmacia.* 60 (2012).

Romay C., Gonzalez R., Ledon N., Ramirez D., Rimbau V., C-phycoyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Curr. Protein Pept. Sci.* 4 (2003), 207–216.

Ropellato J., Carvalho M.M., Ferreira L.G., Nosedá M.D., Zuconelli C.R., Gonçalves A.G., Ducatti D.R.B., Kenski J.C.N., Nasato P.L., Winnischofer S.M.B., Duarte M.E.R., Sulfated heterorhamnans from the green seaweed *Gayralia oxysperma*: partial depolymerization, chemical structure and antitumor activity. *Carbohydr. Polym.* 117 (2015), 476–485.

Rotatore C., Colman B., Kuzma M., The active uptake of carbon dioxide by the marine diatoms *Phaeodactylum ticornutum* and *Cyclotella* sp. *Plant Cell. Environ.* 18 (1995), 913–918.

Roussel M., Villay A., Delbac F., Michaud P., Laroche C., Roriz D., El Alaoui H., Diogon M., Antimicrosporidian activity of sulphated polysaccharides from algae and their potential to control honeybee nosemosis. *Carbohydr. Polym.* 133 (2015), 213–220.

Roy S., Llewellyn C., Skartstad E., Johnsen G., Phytoplankton pigments characterization, chemotaxonomy and applications in oceanography, P. University, Ed. Cambridge. **2011**.

S

Sadovskaya I., Souissi A., Souissi S., Grard T., Lencel P., Greene C., Duin S., Dmitrenok P., Chizhov A., Shashkov A., Usov A., Chemical structure and biological activity of a highly branched (1 → 3,1 → 6)-β-d-glucan from *Isochrysis galbana*. *Carbohydr. Polym.* 111 (**2014**), 139–148.

Sakurai T., Aoki M., Ju X., Ueda T., Nakamura Y., Fujiwara S., Umemura T., Tsuzuki M., Minoda A., Profiling of lipid and glycogen accumulations under different growth conditions in the sulfothermophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Bioresour. Technol.* 200 (**2016**), 861–866.

Salah F., ElGhoul Y., Mahdhi A., Majdoub H., Jarroux N., Sakli F., Effect of the deacetylation degree on the antibacterial and antibiofilm activity of acemannan from *Aloe vera*. *Ind. Crop. Prod.* 103 (**2017**), 13–18.

Santiago-Santos M.C., Ponce-Noyola T., Olvera-Ramírez R., Ortega-López J., Cañizares-Villanueva R.O., Extraction and purification of phycocyanin from *Calothrix* sp. *Process Biochem.* 39 (**2004**), 2047–2052.

Sarmadi B.H., Ismail A., Antioxidative peptides from food proteins: a review, *Peptides* 31 (**2012**), 1949–1956.

Sato N., Moriyama T., Mori N., Toyoshima M., Lipid metabolism and potentials of biofuel and high added-value oil production in red algae. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 33 (**2017**), 74.

Schilling S., Oesterhelt C., Structurally reduced monosaccharide transporters in an evolutionarily conserved red alga. *Biochem. J.* 406 (**2007**), 325–331.

Schmidt R.A., Wiebe M.G., Eriksen N.T., Heterotrophic high cell density fed-batch cultures of the phycocyanin producing red alga *Galdieria sulphuraria*. *Biotechnol. Bioeng.* 90 (**2005**), 77–84.

Scott J., Yang E.C., West J.A., Yokoyama A., Kim H.J., Loideaux de Goër S., O'Kelly C.J., Orlova E., Kim S.Y., Park J.K., Yoon H.S., On the genus *Rhodella*, the emended orders Dixoniellales and Rhodellales with a new order Glaucosphaerales (Rhodellophyceae, Rhodophyta). *Algae* 26 (2011), 277–288.

Scott J.L., Yokoyama A., Billard C., Fresnel J., Hara Y., West K.A., West J.A., *Neorhodella cyanea*, a new Genus in the Rhodellophyceae (Rhodophyta). *Phycologia* 47 (2008), 560–572.

Serive B., Nicolau E., Bérard J.B., Kaas R., Pasquet V., Picot L., Cadoret J.P., Community analysis of pigment patterns from 37 microalgae strains reveals new carotenoids and porphyrins characteristic of distinct strains and taxonomic groups. *Plos One* 12 (2017).

Shahidi F., Zhong Y., Measurement of antioxidant activity. *J. Funct. Foods* 18 (2015), 757–781.

Shen S., Jia S., Wu Y., Yan R., Lin Y., Zhao D.X., Han P.P., Effect of culture conditions on the physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharides from *Nostoc flagelliforme*. *Carbohydr. Polym.* 198 (2018), 426–433.

Shimonaga T., Fujiwara S., Kaneko M., Izumo A., Nihei S., Francisco P.B., Satoh A., Fujita N., Nakamura Y., Tsuzuki M., Variation in Storage α -Polyglucans of Red Algae: Amylose and Semi-Amylopectin Types in *Porphyridium* and Glycogen Type in *Cyanidium*. *Mar. Biotechnol.* 9 (2007), 192–202.

Shimonaga T., Konishi M., Oyama Y., Fujiwara S., Satoh A., Fujita N., Colleoni C., Buléon A., Putaux J.L., Ball S.G., Yokoyama A., Hara Y., Nakamura Y., Tsuzuki M., Variation in Storage α -Glucans of the Porphyridiales (Rhodophyta). *Plant Cell Physiol.* 49 (2008), 103–116.

Sialve B., Steyer J.P., Les microalgues, promesses et défis. *Innov. Agron.* 26 (2013), 25–39.

Silva P.C., Moe R.L., Taxonomic classification of algae, in: Lobban C.S., Harrison P.J. (Eds.), *Seaweed ecology and phycology*, Cambridge University press, New York, 1997, pp. 301–308.

Silva-Dias A., Palmeira-de-Oliveira A., Miranda I.M., Branco J., Cobrado L., Monteiro-Soares M., Queiroz J.A., Pina-Vaz C., Rodrigues A.G., Anti-biofilm activity of low-molecular

weight chitosan hydrogel against *Candida* species. *Med. Microbiol. Immunol.* 203 (2014), 25–33.

Singh S., Arad S.M., Richmond A., Extracellular polysaccharide production in outdoor mass cultures of *Porphyridium sp.* in flat plate glass reactors. *J. Appl. Phycol.* 12 (2000), 269–275.

Sloth J.K., Wiebe M.G., Eriksen N.T., Accumulation of phycocyanin in heterotrophic and mixotrophic cultures of the acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Enzyme Microb. Technol.* 38 (2006), 168–175.

Soanen N., Silva E.D., Gardarin C., Michaud P., Laroche C., Improvement of exopolysaccharide production by *Porphyridium marinum*. *Bioresour. Technol.* 213 (2016), 231–238.

Sonani R.R., Singh N.K., Kumar J., Thakar D., Madamwar D., Concurrent purification and antioxidant activity of phycobiliproteins from *Lyngbya sp.* A09DM: An antioxidant and antiaging potential of phycoerythrin in *Caenorhabditis elegans*. *Process Biochem.* 49 (2014), 1757–1766.

Song M., Pei H., The growth and lipid accumulation of *Scenedesmus quadricauda* during batch mixotrophic/heterotrophic cultivation using xylose as a carbon source. *Bioresour. Technol.* 263 (2018), 525–531.

Soni B., Kalavadia B., Trivedi U., Madamwar D., Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata*—Isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India. *Process Biochem.* 41 (2006), 2017–2023.

Soni B., Trivedi U., Madamwar D., A novel method of single step hydrophobic interaction chromatography for the purification of phycocyanin from *Phormidium fragile* and its characterization for antioxidant property. *Bioresour. Technol.* 99 (2008), 188–194.

Stein R., Gross W., Schnarrenberger C., Characterization of a xylitol dehydrogenase and a D-arabitol dehydrogenase from the thermo- and acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Planta* 202 (1997), 487–493.

Stengel D.B., Connan S., Popper Z.A., Algal chemodiversity and bioactivity: sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnol. Adv.* 29 (2011), 483–501.

Sun L., Wang C., Shi Q., Ma C., Preparation of different molecular weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum* and their antioxidant activities. *Int. J. Biol. Macromol.* 45 (2009), 42–47.

Sun L., Wang L., Zhou Y., Immunomodulation and an titumor activities of different molecular-weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum*. *Carbohydr. Polym.* 87(2012), 1206–1210.

Sun L., Wang S., Chen L., Gong X., Promising fluorescent probes from phycobiliproteins. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* 9 (2003), 177–188.

Sun R., Tomkinson J., Characterization of hemicelluloses obtained by classical and ultrasonically assisted extractions from wheat straw. *Carbohydr. Polym.* 50 (2002), 263–271.

Syrett P., Wong H., The fermentation of glucose by *Chlorella vulgaris*. *Biochem. J.* 89 (1963), 308–315.

T

Taberner A., Martín del Valle E.M., Galán M.A., Evaluating the industrial potential of biodiesel from a microalgae heterotrophic culture: scale-up and economics. *Biochem. Eng. J.* 63 (2012), 104–115.

Tang Z., Jilu Z., Ju B., Li W., Wen S., Pu Y., Qin S., One-step chromatographic procedure for purification of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. *Protein Expr. Purif.* 123 (2016), 70–74.

Tannin-Spitz T., Bergman M., van Moppes D., Grossman S., Arad S.M., Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalga *Porphyridium* sp. *J. Appl. Phycol.* 17 (2005), 215–222.

Telford W.G., Moss M.W., Morseman J.P., Allnut F., Cyanobacterial stabilized phycobilisomes as fluorochromes for extracellular antigen detection by flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 254 (2001), 13–30.

Tibbetts S., Milley J., Lall S., Chemical composition and nutritional properties of freshwater and marine microalgal biomass cultured in photobioreactors. *J. Appl Phycol.* 27(2015), 1109–1119.

Tran K.C., Mendoza M.J.L., Heaven S., Banks C.J., Acien F.F.G., Molina G.E., Cultivation and anaerobic digestion of *Scenedesmus* spp. grown in a pilot-scale open raceway. *Algal Res.* 5 (2014), 95–102.

Turner J., A note on the nutrition of *Rhodella*. *Brit. Phycol. J.* 5 (1970), 15–18.

Tyihák E., Móricz Á.M., BioArena system for studying key molecules as well as ingredients in biological samples. *Forced-Flow layer Chromatogr.* (2016), 397–485.

U

Usov A.I., Polysaccharides of the red algae. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 65 (2011), 115–217.

V

Vale-Silva L.A., Buchta V., Valentova E., Effect of sub-inhibitory concentration of some established and experimental antifungal compounds on the germ tube formation in *Candida albicans*. *Folia Microbiol.* 52 (2007), 39–43.

Vazhappilly R., Chen F., Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid production potential of microalgae and their heterotrophic growth. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75 (1998), 393–397.

Vidyashankar S., Deviprasad K., Chauhan V.S., Ravishankar G.A., Sarada R., Selection and evaluation of CO₂ tolerant indigenous microalga *Scenedesmus dimorphus* for unsaturated fatty acid rich lipid production under different culture conditions. *Bioresour. Technol.* 144 (2013), 28–37.

Vijayabaskar P., Vaseela N., Thirumaran G., Potential antibacterial and antioxidant properties of a sulfated polysaccharide from the brown marine algae *Sargassum swartzii*. *Chin. J. Nat. Medicines.* 10 (2012), 421–428.

Villay A., de Filippis F.L., Picton L., Cerf D.L., Vial C., Michaud P., Comparison of polysaccharide degradations by dynamic high-pressure homogenization. *Food Hydrocoll.* 27 (2012), 278–286.

Villay A., Laroche C., Roriz D., El-Alaoui H., Delbacq F., Michaud P., Optimisation of culture parameters for exopolysaccharides production by the microalga *Rhodella violacea*. *Bioresour. Technol.* 146 (2013), 732–735.

Vonshak A., Cohen Z., Richmond A., The feasibility of mass cultivation of *Porphyridium*. *Biomass* 8 (1985), 13–25.

Vonshak A., Torzillo G., Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology, Environmental Stress Physiology. 2004.

W

Wang J., Yang H., Wang F., Mixotrophic Cultivation of Microalgae for Biodiesel Production: Status and Prospects. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172 (2014), 3307–3329.

Wang J., Zhang Q., Zhang Z., Li Z., Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. *Int. J. Biol. Macromol.* 42 (2008), 127–132.

Wei L., Xin Y., Wang D., Jing X., Zhou Q., Su X., Jia J., Ning K., Chen F., Hu Q., Xu J., *Nannochloropsis* plastid and mitochondrial phylogenomes reveal organelle diversification mechanism and intragenus phylotyping strategy in microalgae. *Genomics* 14 (2013), 53.

Wells M.L., Potin P., Craigie J.S., Raven J.A., Merchant S.S., Helliwell K.E., Smith A.G., Camire M.E., Braxley S.H., Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. *J. Appl. Phycol.* 29 (2017), 949–982.

Wiethaus J., Busch A.W.U., Dammeyer T., Frankenberg-Dinkel T., Phycobiliproteins in *Prochlorococcus marinus*: Biosynthesis of pigments and their assembly into proteins. *Eur. J. Cell. Biol.* 89 (2010), 1005–1010.

Wollman F., Girard-Bascou J., Une algue pour l'étude de la génétique des organites: *Chlamydomonas reinhardtii*. *Med. Sci.* 10 (1994), 1–14

X

Xie F., Zhang W., Lan X., Gong S., Wu J., Wang Z., Effects of high hydrostatic pressure and high pressure homogenization processing on characteristics of potato peel waste pectin, *Carbohydr. Polym.* 196 (2018), 474–482.

Xu H., Miao X., Wu Q., High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *J. Biotechnol.* 126 (2006), 499–507.

Y

Yamaoka A., Ozawa Y., Ueno Y., Endo T., Morimoto Y., Urushiyama A., Ohmori D., Imai T., *Cyanidioschyzon merolae* ferredoxin: a high resolution crystal structure analysis and its thermal stability. *FEBS Lett.* 585 (2011), 1299–1302.

Yamashita S., Sugita-Konishi Y., Shimizu M., *In vitro* Bacteriostatic Effects of Dietary Polysaccharides. *Food Sci. Technol. Res.* 7 (2001), 262–264.

Yang C., Hua Q., Shimizu K., Carbon metabolism during growth under photoautotrophic, mixotrophic and autotrophic/dark-heterotrophic conditions. *Biochem. Eng. J.* 6, (2000) 87–102.

Yang E.C., Scott J., West J.A., Orlova E., Gauthier D., Küpper F.C., Yoon H.S., Karsten U., New taxa of the Porphyridiophyceae (Rhodophyta): *Timspurckia oligopyrenoides* gen. et sp. nov. and *Erythrolobus madagascarensis* sp. nov. *Phycologia* 49 (2010), 604–616.

Yang Y., Gao K., Effects of CO₂ concentrations on the freshwater microalgae, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyta). *J. Appl. Phycol.* 15 (2003), 379–389.

Yarnpakdee S., Benjakul S., Kristinsson H.G., Kishimura H., Antioxidant and sensory properties of protein hydrolysate derived from *Nile tilapia* (*Oreochromis niloticus*) by one- and two-step hydrolysis, *J. Food Sci. Technol.* 52 (2015), 3336–3349.

Yaron A., Cohen E., Arad S.M., Stabilization of aloe vera gel by interaction with sulfated polysaccharides from red microalgae and with xanthan gum. *J. Agric. Food Chem.* 40 (1992), 1316–1320.

Ye Y., Huang Y., Xia A., Fu Q., Liao Q., Zeng W., Zheng Y., Zhu X., Optimizing culture conditions for heterotrophic-assisted photoautotrophic biofilm growth of *Chlorella vulgaris* to simultaneously improve microalgae biomass and lipid productivity. *Bioresour. Technol.* 270 (2018), 80–87.

Ye Y., Le Clech P., Chen V., Fane A.G., Evolution of fouling during cross flow filtration of model EPS solutions. *J. Membr. Sci.* 264 (2005), 190–199.

Yim J., Son E., Pyo S., Lee H., Novel sulfated polysaccharide derived from red-tide microalga *Gyrodinium impudicum* strain KG03 with immunostimulating activity *in vivo*. *Mar. Biotechnol.* 7 (2005), 331–338.

Ying K., Gilmour D.J., Zimmerman W.B., Effects of CO₂ and pH on Growth of the Microalga *Dunaliella salina*. *J. Microb. Biochem. Technol.* 6 (2014), 167–173.

Yoon H.S., Müller K.M., Sheath R.G., Ott F.D., Bhattacharya D., Defining the major lineages of red algae (Rhodophyta). *J. Phycol.* 42 (2006), 482–492.

You T., Barnett S.M., Effect of light quality on production of extracellular polysaccharides and growth rate of *Porphyridium cruentum*. *Biochem. Eng. J.* 19 (2004), 251–258.

Yu S., Blennow A., Bojko M., Madsen F., Olsen C.E., Engelsen S.B., Physico-chemical characterization of floridean starch of red algae. *Starch* 54 (2002), 66–74.

Z

Zhang L., Ye X., Xue S., Zhang X., Liu D., Meng R., Chen S., Effect of high-intensity ultrasound on the physicochemical properties and nanostructure of citrus pectin. *J. Sci. Food Agr.* 93 (2013), 2028–2036.

Zhao K.H., Porra R.J., Scheer H., Phycobiliproteins, in: Roy S., Llewellyn C., Egeland E.S., Johnsen G., *Phytoplankton pigments Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography*, Cambridge university press, New York, 2011.

Zhou G., Sun Y., Xin H., Zhang Y., Li Z., Xu Z., *In vivo* antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from *Chondrus ocellatus*. *Pharmacol. Res.* (2004).

Zhou G.F., Sheng W.X., Yao W.D., Wang C.H., Effect of low molecular λ -carrageenan from *Chondrus ocellatus* on antitumor H-22 activity of 5-Fu. *Pharmacol. Res.* 53 (2006), 129–124.

Zhu X.L., Chen A.F., Lin Z.B., *Ganoderma lucidum* polysaccharides enhance the function of immunological effector cells in immunosuppressed mice. *J. Ethnopharmacol.* 111 (2007), 219–226.

Zimm B.H., The Scattering of Light and the Radial Distribution Function of High Polymer Solutions. *J. Chem. Phys.* 16 (1948).

Résumé

La présente étude s'attache à étudier l'effet d'une source de carbone organique sélectionnée sur la croissance et la production de métabolites de la microalgue rouge *Porphyridium marinum*. Cette dernière s'est montrée incapable de se multiplier en hétérotrophie, en absence totale de lumière. Cependant, en condition mixotrophique la production de biomasse, lipides et de phycobiliprotéines par *P. marinum* a été améliorée en comparaison avec la condition autotrophique. Les teneurs en exopolysaccharides ont été presque similaires dans les deux conditions. Dans le but de valoriser ces métabolites, l'effet antioxydant, antibactérien, antibiofilm et anticancéreux ont été testés. L'exopolysaccharide de *P. marinum* ainsi que ses dérivés de faible poids moléculaire (EPS-2P et EPS-5P) ont tous présenté des activités antibactériennes et antibiofilm à différentes concentrations. Cependant l'EPS-2P et l'EPS-5P ont été jugés plus efficaces pour l'activité anticancéreuse contre les cellules de cancer de sein. D'autre part, la production du pigment majoritaire des microalgues rouges, la B-phycoerythrine (B-PE), a été optimisée moyennant des plans d'expériences adaptés. Une teneur de 40 mg/g MS a été obtenue en faisant varier la concentration en NaNO_3 , K_2HPO_4 et solution métallique ainsi que l'intensité lumineuse. Après purification, la molécule optimisée a montré une activité antioxydante en termes de piégeage des radicaux libres DPPH, chélation et réduction des ions de fer et inhibition de la décoloration du β -carotène. Nos données suggèrent alors que les métabolites produits par la microalgue rouge *P. marinum* peuvent être potentiellement utilisés dans plusieurs applications à savoir cosmétiques et pharmaceutiques.

Mots Clés: *P. marinum*, autotrophie, mixotrophie, exopolysaccharides, lipides, B-phycoérythrine, activités antioxydantes, activités biologiques

Abstract

The present study investigates the effect of a selected organic carbon source on the growth and production of metabolites of the red microalga *Porphyridium marinum*. The latter has been unable to multiply in heterotrophy, in total absence of light. However, in mixotrophic condition the productions of biomass, lipids and phycobiliproteins by *P. marinum* have been improved in comparison with the autotrophic condition. The contents of exopolysaccharide were almost similar under both conditions. In order to valorize these metabolites, the antioxidant, antibacterial, antibiofilm and anticancer effect were tested. The exopolysaccharide of *P. marinum* as well as its low molecular weight derivatives (EPS-2P and EPS-5P) have all exhibited antibacterial and antibiofilm activities at different concentrations. However, EPS-2P and EPS-5P were found to be more effective for anti-cancer activity against breast cancer cells. On the other hand, the production of the majority pigment of red microalgae, B-phycoerythrin (B-PE), has been optimized by means of adapted experimental plans. A content of 40 mg/g DW was obtained by varying the concentration of NaNO_3 , K_2HPO_4 and metal solution as well as the light intensity. After purification, the optimized molecule showed antioxidant activity in terms of free radical scavenging DPPH, chelation and reduction of iron ions and β -carotene bleaching inhibition. Our data suggest that the metabolites produced by the red microalga *P. marinum* may be potentially used in several applications namely cosmetic and pharmaceutical.

Keywords: *P. marinum*, autotrophy, mixotrophy, exopolysaccharides, lipids, B-phycoerythrin, Antioxidant activities, biological activities