



HAL
open science

Bioraffinerie de la microalgue *Haematococcus pluvialis*

Fatou Ba

► **To cite this version:**

Fatou Ba. Bioraffinerie de la microalgue *Haematococcus pluvialis*. Génie des procédés. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2016. Français. NNT : 2016CLF22766 . tel-03035517

HAL Id: tel-03035517

<https://theses.hal.science/tel-03035517>

Submitted on 2 Dec 2020

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.

N° d'ordre : D. U : 2766

EDSPIC : 778

UNIVERSITE BLAISE PASCAL

ECOLE DOCTORALE
SCIENCES POUR L'INGENIEUR DE CLERMONT-FERRAND

Thèse

Présentée par

Fatou BA

pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

SPÉCIALITÉ : GÉNIE DES PROCÉDÉS

Bioraffinerie de la microalgue *Haematococcus pluvialis*

Soutenue publiquement le 09 Décembre 2016 devant le jury :

M. Christian LARROCHE, Professeur, Université Blaise Pascal	Président
M. Luc MARCHAL, MCF HDR, Université de Nantes	Rapporteur
M. Patrick BOURSEAU, Professeur, Université de Bretagne Sud	Rapporteur
Mme Isabelle PEZRON, Professeur, Université de Technologie de Compiègne	Examinatrice
M. Gholamreza DJELVEH, Professeur, Université Blaise Pascal	Co-directeur de thèse
Mme Céline LAROCHE, MCF HDR, Université Blaise Pascal	Co-directrice de thèse

Ce travail a été réalisé à l'Université Blaise Pascal, au sein de l'Institut Pascal UMR CNRS 6602 – Axe Génie des Procédés Energétique et Biosystèmes



Ce travail a bénéficié d'une aide de l'État gérée par l'Agence Nationale de la Recherche au titre du programme Investissements d'avenir dans le cadre du projet LabEx IMobS3 (ANR-10-LABX-16-01), d'une aide de l'Union Européenne au titre du Programme Compétitivité Régionale et Emploi 2007-2013 (FEDER – Région Auvergne) et d'une aide de la Région Auvergne



Ce travail est cofinancé par l'Union européenne.
L'Europe s'engage en Auvergne avec le Fonds
européen de développement régional.

Remerciements

Je remercie le Pr Michel DHOME directeur de l'Institut Pascal et du labex IMOBS³, ainsi que le Pr Claude-Gilles DUSSAP responsable de l'axe GePEB pour m'avoir accueillie au sein de leur établissement.

J'adresse mes remerciements à mes directeurs de thèse, le Pr Gholamreza DJELVEH et le Dr Céline LAROCHE, pour leur encadrement de qualité et leur investissement dans ce projet de thèse.

Je tiens également à remercier le Dr Luc MARCHAL et le Pr Patrick BOURSEAU d'avoir accepté la charge de rapporteur. Je remercie également le Pr Isabelle PEZRON et le Pr Christian LAROCHE d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Un grand merci à toutes les personnes de l'Institut Pascal qui m'ont aidée de près ou de loin dans mon travail. Je tiens spécialement à exprimer ma gratitude à Alina, Christine, Numidia, et tout le deuxième étage qui ont tous participé à maintenir ma motivation tout le long de la thèse.

Les meilleurs pour la fin : A mes parents, ce duo de patience et de courage qui m'a façonnée. A Papis et Mami Ba, nous formons la meilleure fraterie au monde. A Musavu et Aya, les amies-sœurs que j'ai la chance d'avoir dans ma vie. Une mention spéciale remplie d'amour à DD (ma source de Sakina), à ma Akila, à mon petit loup Mohamed Ayoub et enfin à Abubakr Ilyas, maman n'aurait pas pu y arriver sans vous.

Al Fatah, merci de m'avoir permis d'aller au bout de ce projet !

Liste des Abréviations

AA : Acides aminés

AG : Acides gras

ATF : Acide trifluoroacétique

APS : Persulfate d'ammonium

BBL : biomasses lyophilisées broyées

BNBL : biomasses lyophilisées non broyées

Borax : tétraborate de sodium

Ca, Chl a : Chlorophylle a

Cb, Chl b : Chlorophylle b

CE : Capacité émulsifiante

CEAHP-DAP : chromatographie échangeuse d'anions haute performance – détecteur à ampérométrie pulsée

CEP : Champs électriques pulsés

CES : Chromatographie d'exclusion stérique

CG : Chromatographie en phase gazeuse

CLHP : Chromatographie Liquide à Haute Pression

CPC: Chromatographie de partage centrifuge

CTAB : hexadécyl-triméthyl-ammonium bromide

C_{x+c} : Caroténoïdes totaux

Da : Dalton

DEDL : Détecteur évaporatif à detection de lumière

D-Gal : D-Galactose

D-GalA : Acide D-Galacturonique

D-GalN : D-Galactosamine

D-Glc : D-Glucose

D-GlcA : Acide D-Glucuronique

D-GlcN : D-Glucosamine

DIF : Détecteur à ionisation de flamme

D-Man : D-Mannose

D-Rib : D-Ribose

D-Xyl : D-Xylose

EAG : Esters d'acides gras

EMAG : Esters méthylés d'acides gras

FAO : *Food and Agriculture Organization*

FAP : Facteur de conversion azote/protéines

FSC : Fluides super-critiques

GalNac : *N*-AcétylGalactosamine

GlcNac : *N*-AcétylGlucosamine

HP : Haute pression

HPR : *Haematococcus pluvialis* rouge

HPV : *Haematococcus pluvialis* verte

IAE : Index d'activité émulsifiante

IAAE : Index des acides aminés essentiels

L-Ara : L-Arabinose

L-Fuc : L-Fucose

LN : Lipides neutres

LP : Lipides polaires

L-Rha : L-Rhamnose

MS : Matière sèche

Mw : *Molecular weight*, masse molaire

PEI: Polyethyleneimine

PHS : Protéines hydrosolubles

pI : Point isoélectrique

PT : Protéines totales

PTM: Pression transmembranaire

SAm : Sulfate d'ammonium

SBr : Surnageant de broyage issu de biomasse « rouge »

SBv : Surnageant de broyage issu de biomasse « verte »

SDS-PAGE : Sodium Dodécyl Sulfate – *Polyacrylamide gel electrophoresis*

SE : Stabilité de l'émulsion

SPE : *Solid Phase Extraction*, extraction en phase solide

TAG : Tri-acyl glycerols

TEMED : Tetramethyl-ethylènediamine

UF : Ultrafiltration

Table des matières

Introduction	1
I. Synthèse Bibliographique	4
1. Introduction à la synthèse bibliographique	5
2. Bioraffinerie : le concept	8
2.1. Définition et classification des bioraffineries	8
2.2. Bioraffinerie Plante Entière	9
2.3. Bioraffinerie Lignocellulosique	9
2.4. Bioraffinerie Verte	9
3. Microalgues	11
3.1. Généralités	11
3.2. Classification	11
3.2.1. Algues brunes	12
3.2.2. Algues rouges	12
3.2.3. Algues bleues	13
3.2.4. Algues vertes	13
3.3. Composés d'intérêts	14
3.3.1. Biomasses entières	15
3.3.2. Lipides	16
3.3.2.1. Caractéristiques	16
3.3.2.2. Applications / valorisations des lipides	19
3.3.3. Pigments	20
3.3.3.1. Caractéristiques	20
3.3.3.2. Chlorophylles	21
3.3.3.3. Caroténoïdes	23
3.3.3.4. Phycobiliprotéines	24
3.3.3.5. Applications / valorisations des pigments	25
3.3.4. Glucides	26

3.3.4.1.	Caractéristiques	26
3.3.4.2.	Applications/ valorisations des glucides	28
3.3.5.	Protéines	29
4.	Extraction des composés d'intérêt	31
4.1.	Méthodes de lyse cellulaire	31
4.1.1.	Méthodes de lyse mécaniques	32
4.1.1.1.	Broyage à billes	32
4.1.1.2.	Homogénéisation à haute pression (HHP)	33
4.1.1.3.	Homogénéisation par Rotor/Stator	34
4.1.1.4.	Microfluidisation	35
4.1.1.5.	Ultrasonication	35
4.1.2.	Méthodes de lyse physiques	36
4.1.2.1.	Microondes	36
4.1.2.2.	Champs électriques pulsés (CEP)	37
4.1.3.	Méthodes de lyse enzymatiques	38
4.1.4.	Méthodes de lyse chimiques	39
4.1.5.	Comparaison des méthodes de lyse	39
4.2.	Méthodes d'extraction	40
4.2.1.	Solvants	40
4.2.2.	Fluides supercritiques (FSC)	42
4.2.3.	Liquides ioniques (LI)	44
5.	Séparation / purification des composés	45
5.1.	Chromatographie de partage centrifuge (CPC)	45
5.1.1.	Le système de solvants	46
5.1.2.	Le mode d'élution	47
5.1.3.	Le débit et la vitesse de rotation	48
5.1.4.	Applications de la CPC	49
5.2.	Méthodes membranaires	50
5.3.	Purification chimique	51

5.3.1. Méthodes usuelles	51
5.3.2. Polyéthylèneimine (PEI)	52
6. Choix de la souche de microalgues	53
6.1. <i>Botryococcus braunii</i>	54
6.2. <i>Dunaliella Salina</i>	55
6.3. <i>Nannochloropsis oculata</i>	56
6.4. <i>Haematococcus pluvialis</i>	57
6.5. Pré-sélection de la souche de travail	58
6.6. La souche retenue : <i>Haematococcus pluvialis</i>	60
6.6.1. Taxonomie	60
6.6.2. Biologie	60
6.6.3. Croissance et Changements morphologiques	60
7. Conclusion à la synthèse bibliographique	62
II. Matériels et méthodes	65
1. <i>Haematococcus pluvialis</i>	66
2. Caractérisation de la biomasse	67
2.1. Teneur en matière sèche	67
2.2. Composition élémentaire	67
3. Quantification et caractérisation des composés	68
3.1. Sucres	68
3.1.1. Hydrolyse acide	68
3.1.2. Oses totaux	68
3.1.3. Dosage de groupements sulfates	68
3.1.4. Amidon	69
3.1.5. Fibres alimentaires	70
3.1.6. Polysaccharides matriciels et fibrillaires	72
3.1.6.1. Dépigmentation	74

3.1.6.2. Extraction	74
3.1.6.3. Purification des polysaccharides matriciels	74
3.1.7. Identification des monosaccharides	74
3.2. Protéines	76
3.2.1. Extraction et quantification des protéines	76
3.2.2.1. Protéines totales et facteur de conversion azote/protéines	76
3.2.1.2. Protéines hydrosolubles	77
3.2.3. Caractérisation des protéines	78
3.2.3.1. Chromatographie d'exclusion stérique (CES)	78
3.2.3.2. Electrophorèse	79
3.3. Lipides	80
3.3.1. Extraction et Quantification des lipides	80
3.3.1.1. Lipides totaux	80
3.3.1.2. Lipides neutres et polaires	80
3.3.2. Caractérisation des acides gras	81
3.3.2.1. Estérification des acides gras	81
3.3.2.2. Analyse par chromatographie en phase gazeuse (CG)	82
3.4. Pigments	83
3.4.1. Quantification des pigments	83
3.4.2. Caractérisation des pigments	84
4. Lyse cellulaire	85
5. Concentration et séparation des composés d'intérêts	86
5.1. Procédé membranaire : Ultrafiltration	86
5.2. Précipitations	88
5.2.1. Flocculation au polyethyleneimine (PEI)	88
5.2.2. Précipitation au sulfate d'ammonium (SAm)	88
5.2.3. Précipitation par variation de pH	89
5.3. Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC)	90

6.	Evaluation des propriétés techno-fonctionnelles	94
6.1.	Capacité Emulsifiante	94
6.2.	Index d'Activité Emulsifiante	95
6.3.	Stabilité de l'émulsion (SE)	95
III.	Résultats et discussion	96
Partie 1	Composition générale et influence du broyage à haute pression	98
1.	Composition générale de <i>H. pluvialis</i>	98
2.	Sucres	100
3.	Protéines	101
4.	Influence de la pression et du nombre de passage sur les lipides et les pigments : Quantification et caractérisation	104
5.	Conclusion partielle	108
Partie 2	Etude des extraits protéiques de HPV et identification d'une potentielle valorisation comme agent émulsifiant	111
1.	Précipitation acide et <i>pI</i> des protéines de HPV	111
2.	Extraction des protéines sous haute pression et à différent pH (natif et neutre)	114
3.	Caractérisation et propriétés émulsifiantes	115
4.	Concentration et fractionnement des protéines	119
4.1.	Ultrafiltration	119
4.2.	Précipitation au sulfate d'ammonium	124
5.	Conclusion partielle	126
Partie 3	Fractionnement de la matrice hydrosoluble extraite de <i>H. pluvialis</i> rouge et valorisation en tant qu'agent émulsifiant	128
1.	Fractionnement du surnageant de <i>H. pluvialis</i> Rouge (HPR)	128
1.1.	Effet de la dilution du surnageant SBR	129
1.2.	Effet du pH sur la floculation au PEI	130
1.3.	Effet de la force ionique	136
1.4.	Influence de la pré-clarification au borax	140

2. Conclusion partielle	142
3. Fractionnement et analyse des hydrosolubles/liposolubles à grande échelle et évaluation des propriétés fonctionnelles	143
3.1. Caractérisation de la fraction hydrosoluble	143
3.2. Caractérisation de la fraction liposoluble	145
3.3. Evaluation des propriétés fonctionnelles des fractions hydrosolubles	151
4. Conclusion partielle	153
Partie 4 Fractionnement lipides / pigments par chromatographie de partage centrifuge	155
1. Choix du système bi-phasique	156
2. Fractionnement par CPC	157
2.1. Système heptane : acétonitrile	157
2.2. Système Heptane : acétonitrile (+ 2 % eau)	159
2.3. Système Heptane : méthanol (+ 2 % eau)	161
3. Fractionnement de l'extrait liposoluble de HPR	163
3.1. Analyses quantitatives des lipides et pigments issus de la CPC	164
3.2. Analyse qualitative des lipides et pigments issus de la CPC	166
3.3. Conclusion partielle	167
Conclusions et perspectives	169
Références bibliographiques	174
Production scientifique	188

Table des Figures

Figure 1 Schéma général d'une bioraffinerie de microalgues	10
Figure 2 Ultrastructure générale des microalgues rouges (Pignolet <i>et al.</i> , 2013).	12
Figure 3 Ultrastructure générale des cyanobactéries (Pignolet <i>et al.</i> , 2013).	13
Figure 4 Ultrastructure générale des microalgues vertes (Pignolet <i>et al.</i> , 2013)	14
Figure 5 Production de biodiesel (mélange d'esters d'acides gras) par transestérification des triacylglycérols. Les R (1, 2 et 3) correspondent aux acides gras synthésés par la microalgue lors de sa croissance.	19
Figure 6 Spectres d'absorption des principaux pigments photosynthétiques (Voet et Voet, 2005).	21
Figure 7 Les chlorophylles <i>a, b, c</i> (1 et 2), <i>d et f</i> .	22
Figure 8 Les alpha (α) et beta (β) carotènes	24
Figure 9 Les principaux caroténoïdes xanthophylles : Astaxanthine, Zéaxanthine, β -cryptoxanthine et Lutéine	24
Figure 10 Schéma récapitulatif des principales méthodes de lyse cellulaire adapté de Günerken <i>et al.</i> , 2015	32
Figure 11 Broyeur à billes industriel, http://www.agt.cl/mining/doc/6_dmq_mill.pdf .	33
Figure 12 Système de piston typique d'un homogénéisateur à pression (Lee <i>et al.</i> , 2012).	34
Figure 13 Diagramme de différentes phases du dioxyde de carbone en fonction de la pression (MPa) et de la température (K)	43
Figure 14 Image d'un appareil de chromatographie de partage centrifuge (Fast CPC (FCPC); Kromaton) et Principe de circulation des phases (mobile et stationnaire) et différentes composantes d'un chromatographe de partage centrifuge http://www.kromaton.com/fr/la-cpc/technologies	46
Figure 15 Illustration des modes ascendant et descendant d'élution de la phase mobile en CPC (Toribio, 2007)	48
Figure 16 Evolution de l'efficacité de la colonne en fonction du type d'écoulement dans une cellule de partage en CPC, du débit de pompage en mode descendant et de la vitesse de rotation pour le système bi-phasique heptane : méthanol (1:1; v/v) d'après Marchal <i>et al.</i> , (2000)	49
Figure 17 Polymère de l'éthylèneimine linéaire (a, Burgess, 1991) et branché (b, http://sigmaaldrich.com)	52

Figure 18 <i>Haematococcus pluvialis</i> verte et rouge. Grossissement x 200. (http://www.schott.com/magazine/english/sol114/sol114_04_photobioreaktor.html)	66
Figure 19 Protocole de quantification des fibres (solubles et insolubles)	71
Figure 20 Schéma récapitulatif de l'extraction des polysaccharides matriciels et fibrillaires selon Ramus (1972)	73
Figure 21 Fractionnement des lipides neutres et polaires	81
Figure 22 Principe de fonctionnement de l'ultrafiltration.	86
Figure 23 Schéma de principe et photo de l'unité de filtration Millipore Cogent M1.	87
Figure 24 Représentation schématique du système d'extraction par CPC utilisé. Les flèches bleues représentent le circuit principal alors que les vertes représentent le circuit auxiliaire. D'après Chaabani 2014.	91
Figure 25 Photo de l'installation de CPC utilisée au laboratoire GEPEA de Saint-Nazaire	91
Figure 26 Influence de la pression sur le rendement d'extraction des lipides de HPV	105
Figure 27 Influence de la pression sur le rendement d'extraction des lipides de HPR	106
Figure 28 Profil d'acides gras des biomasses lyophilisées broyées (BBL) ou non broyées (BNBL) de HPR et HPV.	108
Figure 29 Quantification et caractérisation des biomasses HPR et HPV. Après broyage (histogrammes à droite), répartition des composés dans le surnageant et le culot de broyage.	110
Figure 30 Courbe de solubilité des protéines du surnageant alcalin HPV (broyage réalisé à pH = 12, 2x2 kbars).	112
Figure 31 Influence du pH de précipitation sur la re-solubilisation en condition alcaline des protéines précipitées par ajout d'acide.	113
Figure 32 Effet de la procédure d'extraction (pression, nombre de passage à 2kbar) sur le rendement en protéines hydrosolubles (PHS) extraites des protéines totales (PT) de la biomasse de HPV.	115
Figure 33 Distribution des masses molaires des protéines extraites et solubilisées à pH natif (5,7 ; a) et à pH alcalin (12 ; b) et analysées en SDS-PAGE.	116
Figure 34 Profils CES des protéines hydrosolubles (---), des pigments chlorophylliens (....) et caroténoïdiens (_._) du surnageant extrait à pH natif (a) et à pH neutre (b).	117
Figure 35 Bilan global d'une extraction/concentration des surnageants de broyage de HPV à pH natif ou neutre sur une base de 100 g de protéines initiales.	120
Figure 36 Profils CES des protéines des surnageants (....), perméats (---) et rétentats (—) à pH natif (a) et à pH neutre (b).	122

- Figure 37** Profils CES des protéines de surnageant de broyage initiale (...) et des protéines précipitées par le sulfate d'ammonium à 90 % de saturation (courbe bleue).. 125
- Figure 38** Influence de la dilution sur la turbidité mesurée à 750 nm (courbe violette, surnageant non traité ; courbe verte, surnageant traité avec 0,075% de PEI) et sur la répartition des protéines dans le surnageant avec ou sans PEI à 0,075% (barres bleues, surnageant non traité ; barres rouges, surnageant traité avec 0,075% de PEI ; valeurs exprimées en % de protéines conservées par rapport au surnageant avant traitement). 130
- Figure 39** Surnageants de HPR témoin et à différentes dilutions avec une solution de PEI à 0,075 % . 130
- Figure 40** Influence de la concentration en PEI sur le pourcentage de protéines conservées (histogrammes bleus) et la turbidité (courbe violette) du surnageant à pH initial (6,3) 131
- Figure 41** Influence de la concentration en PEI sur le pourcentage de protéines conservées (histogrammes bleus) et la turbidité (courbe violette) du surnageant à pH 7,4. 132
- Figure 42** Influence de la concentration en PEI sur le pourcentage de protéines conservées (histogrammes bleus) et la turbidité (courbe violette) du surnageant à pH 8,5. 133
- Figure 43** Influence de la concentration en PEI sur le pourcentage de protéines conservées (histogrammes bleus) et la turbidité (courbe violette) du surnageant à pH 8,5. 134
- Figure 44** Profils CES des protéines solubles dans le surnageant de broyage de *H. pluvialis* rouge. Courbe verte : absorbance à 660 nm (majoritairement chlorophylles); courbe rouge : absorbance à 470 nm (majoritairement caroténoïdes), courbe bleue : absorbance à 280 nm (protéines). 135
- Figure 45** Profils CES des protéines conservées après traitement à 0,025% PEI du surnageant de *H. pluvialis* rouge dilué au 1/2 et traité à pH 7,4. Courbe verte : absorbance à 660nm (majoritairement chlorophylles); courbe rouge : absorbance à 470nm (majoritairement caroténoïdes), courbe bleue : absorbance à 280 nm (protéines). 136
- Figure 46** Influence de la teneur en NaCl (0 à 1000 mM) sur la turbidité (courbe rouge) et le pourcentage de protéines conservées (histogrammes bleus) pour des surnageants de broyage de HPR dilués au 1/2 à pH 7,4 et en présence de PEI (0,025 %, a ; 0,075 %, b et 0,100 %, c). 137
- Figure 47** Influence de la teneur en NaCl (0 à 1000 mM) sur la turbidité (courbe rouge) et le pourcentage de protéines conservées (histogrammes bleus) pour des surnageants de broyage de HPR dilués au 2/3 à pH 8, 5 et en présence de 0,075 % (a) ou 0,100 % (b) de PEI. 139
- Figure 48** Influence de la pré-clarification au borax sur la teneur en protéines (histogrammes bleus : sans borax ; histogrammes rouges : avec borax) et la turbidité (courbes vertes : sans

borax ; courbes violettes : avec borax) des surnageants de HPR à différents pourcentage de PEI (a) et en fonction de la concentration en NaCl (b, c)	141
Figure 49 Influence des pourcentages de PEI et du pH sur les sucres du surnageant de broyage de <i>H. pluvialis</i> rouge.	142
Figure 50 Profils d'élution en chromatographie d'exclusion stérique du surnageant de broyage (a), du surnageant de floculation obtenu avec 0,075 % de PEI à pH 7,4 (b) et du surnageant de floculation obtenu avec 0,100% de PEI à pH 8,5 (c). Courbe verte : absorbance à 660 nm (majoritairement chlorophylles); courbe rouge : absorbance à 470 nm (majoritairement caroténoïdes), courbe bleue : absorbance à 280 nm (protéines).	146
Figure 51 Spectres CLHP du surnageant de broyage (a), du culot de floculation obtenu pour 0,075 % de PEI à pH 7,4 (b), du culot de floculation obtenu pour 0,100 % de PEI à pH 8,5 (c), et du surnageant de floculation obtenu pour 0,075 % de PEI à pH 7,4 (d).	149
Figure 52 Profils de répartition des acides gras analysés en chromatographie en phase gazeuse pour les lipides extraits du surnageant de broyage (bleu) et du culot de floculation obtenu pour 0,075 % de PEI à pH 7,5 (rouge). ni : non identifié.	150
Figure 53 Echantillons de phase mobile (acétonitrile) récoltés en cours d'analyse CPC (a) en mode descendant avec un système heptane : acétonitrile et exemple d'un spectre (b).	158
Figure 54 Tubes contenant les échantillons de phase mobile (acétonitrile + 2 % eau) récoltés en cours d'analyse CPC en mode descendant avec un système heptane : acétonitrile (+ 2 % eau) (a) et signal DEDL superposé aux courbes de concentrations en pigments (chlorophylles <i>a</i> (courbe vert foncé) et <i>b</i> (courbe vert clair), caroténoïdes (courbe orange)) des aliquots de phase mobile récoltés.	160
Figure 55 Tubes contenant échantillons de phase mobile (acétonitrile+2%eau) récoltés en cours d'analyse CPC en mode descendant avec un système heptane : méthanol (+ 2 % eau) (a) et signal DEDL superposé aux courbes de concentrations en pigments (chlorophylles <i>a</i> (courbe vert foncé) et <i>b</i> (courbe vert clair), caroténoïdes (courbe orange)) des fractions de phase mobile récoltés.	162
Figure 56 Répartition des lipides et pigments élués dans la phase mobile méthanol (+ 2 % eau) de l'étape 1 et heptane de l'étape 2 au cours de la CPC en Dual Mode. Chlorophylles <i>a</i> : courbe vert foncé ; chlorophylle <i>b</i> ; courbe vert clair ; caroténoïdes : courbe orange ; lipides : courbe bleue.	164
Figure 57 Profils CG de l'injectat initial (courbe bleue) et du tube 19 (courbe rouge) collecté au début du Dual Mode.	167
Figure 58 Proposition de schéma intégré pour la bioraffinerie de <i>H. pluvialis</i> rouge.	172

Table des tableaux

Tableau 1 Comparaison des microalgues avec d'autres sources végétales pour la production de biodiesel (d'après Gonzalez-Delgado et Kafarov, 2011).	7
Tableau 2 Teneurs moyennes en composés principaux (protéines, glucides et lipides) de quelques microalgues en comparaison avec des aliments.	15
Tableau 3 Profils des acides aminés de certaines microalgues comparés aux recommandations de la FAO, de soja et d'œuf.	30
Tableau 4 Comparaison de l'efficacité et de la consommation énergétique des méthodes de lyse mécaniques et physiques d'après Lee <i>et al.</i> , 2012.	40
Tableau 5 Exemples de solvants d'extraction de différents composés d'intérêts utilisés sur différentes souches de microalgues ainsi que les méthodes de lyse associées	42
Tableau 6 Composition des microalgues d'intérêts et leurs applications	59
Tableau 7 Gradient utilisé en CEAHP pour l'analyse des monosaccharides	75
Tableau 8 Liste des acides gras méthylés utilisés en standards de calibration à l'Institut Pascal et temps de rétention relevés pour cette méthode	83
Tableau 9 Systèmes bi-phasiques potentiels pour la CPC.	93
Tableau 10 Paramètres opératoires utilisés lors des essais de fractionnement par CPC	94
Tableau 11 Composition élémentaire d' <i>H. pluvialis</i> vert (HPV) et rouge (HPR)	98
Tableau 12 Teneur en acides aminés de la biomasse de <i>H. pluvialis</i> verte, comparaison avec les teneurs proposées par Lorentz (1999) et quelques exemples des teneurs références en acides aminés selon la FAO (Food and Agricultural Organization)	102
Tableau 13 Propriétés émulsifiantes: capacité émulsifiante (CE, mL d'huile / g de protéines), stabilité d'émulsification (SE, %) et index de l'activité émulsifiante (IAE, m ² /g) des surnageants à pH natif (5,7) et neutre	118
Tableau 14 Composition en protéines, sucres, lipides et pigments des surnageants de broyages, rétentats et perméats.	124
Tableau 15 Comparaison des mesures de turbidité à 750 nm et des résultats de dosages de protéines et de sucres obtenus pour des volumes traités de 25 mL et 500 mL pour les 3 conditions retenues..	144
Tableau 16 Quantification des chlorophylles <i>a</i> , <i>b</i> et caroténoïdes au spectrophotomètre selon la méthode Lichtenthaler et Buschmann (2001).	147

Tableau 17 Répartition des acides gras analysés en chromatographie en phase gazeuse pour les lipides extraits du surnageant de broyage et des culots de floculation obtenus pour 0,075% de PEI à pH 7,5 et 0,100 % de PEI à pH 8,5.	150
Tableau 18 Propriétés émulsifiantes du surnageant de broyage (SBr) et des surnageants de floculation obtenus avec 0,075 % de PEI à pH 7,4 et 0,100 % de PEI à pH 8,5.	152
Tableau 19 Valeurs de K_D indicatives pour les pigments dans les 2 systèmes de solvants	157
Tableau 20 Concentrations en chlorophylle <i>a</i> (Chl <i>a</i>), en chlorophylle <i>b</i> (Chl <i>b</i>) et en caroténoïdes (Cx+c) des phases stationnaire et mobile de l'extrudat issu de l'essai CPC heptane : acétonitrile (+ 2 % eau) et identification des acides gras présents.	161
Tableau 21 Concentrations en chlorophylle <i>a</i> (Chl <i>a</i>), en chlorophylle <i>b</i> (Chl <i>b</i>) et en caroténoïdes (Cx+c) des phases stationnaire et mobile de l'extrudat issu de l'essai CPC heptane : méthanol (+ 2 % eau) et identification des acides gras présents.	163

Introduction

La crise énergétique due à l'épuisement des énergies fossiles comme le pétrole et le réchauffement climatique est une motivation largement suffisante pour rechercher d'autres formes d'énergies propres issues de sources renouvelables. Après la première et la deuxième générations d'énergies renouvelables, les bioénergies issues de microorganismes telles que le biodiesel, le bioéthanol ainsi que le biohydrogène sont considérées comme les meilleures alternatives énergétiques que le monde puisse s'offrir (Chen *et al.*, 2013). Les microalgues sont considérées comme de potentielles sources pour la production de ces biocarburants (Templeton *et al.*, 2012). Ces microalgues, végétaux inférieurs phototrophes, participent activement à la production de l'O₂ atmosphérique. Par leur taille, de l'ordre du micromètre, leur temps de génération de l'ordre de 24 heures, leur diversité taxonomique (40 000 espèces dont 100 étudiées et 10 exploitées), leur capacité à utiliser les rejets industriels de CO₂, et la non-compétition avec les terres cultivables pour leur production, les microalgues constituent un vivier pour de nouvelles applications scientifiques et économiques, le potentiel de découverte de nouvelles molécules ou extraits novateurs étant élevé. Le regain d'intérêt de la communauté scientifique pour le développement de procédés de culture à grande échelle utilisables dans le domaine des bioénergies est très clairement observable depuis quelques années. Les recherches sont principalement orientées vers la production d'extraits lipidiques de microalgues utilisables comme biodiesel. Néanmoins, les coûts de transformation sont encore trop élevés pour être rentables, menant à une nécessité de trouver des sous-produits à haute valeur ajoutée en plus du biocarburant. Selon les espèces, divers composés peuvent être extraits comme des pigments, antioxydants, polysaccharides, des acides gras à longue chaîne, des vitamines et de la biomasse, qui peuvent être exploités dans différents secteurs industriels (produits pharmaceutiques, cosmétiques, nutraceutiques, aliments fonctionnels...).

La bioraffinerie de microalgue consiste à extraire l'ensemble des fractions qui la compose sans que les propriétés des différentes molécules soient affectées par les méthodes mises en jeu. Le développement de cette nouvelle génération de bioraffinerie s'inscrit comme l'un des défis du laboratoire d'excellence IMOBS³ porté par l'Université Blaise Pascal et qui vise, entre autres, à développer des procédés innovants de production d'énergie pour la mobilité.

Les microalgues les plus étudiées aujourd'hui pour la production de biocarburants, sont les microalgues vertes (*Chlorella*, *Chlamydomonas*,...), la cyanobactérie *Arthrospira platensis* et des microalgues qualifiées d'oléagineuses telles que *Botryococcus braunii*, *Dunaliella sp.*, ou *Nannochloropsis sp.* En effet, en fonction des conditions de culture, certaines de ces souches sont capables d'accumuler jusqu'à 50 à 70% de leur masse sèche sous forme de lipides, en

particulier des triacyl-glycérols (TAG) pouvant facilement être convertis en biodiesel. Néanmoins, les particularités morphologiques et/ou de composition de ces souches font qu'il est impossible de proposer un schéma unique de bioraffinerie de microalgue, mais plusieurs, avec un choix des procédés mis en œuvre au cas par cas.

Dans ce contexte, *Haematococcus pluvialis* a été choisie comme modèle de microalgue, afin de développer les procédés de séparation permettant d'obtenir différentes fractions valorisables. Cette microalgue est industriellement exploitée pour son pigment liposoluble, l'astaxanthine, dont le prix de vente varie entre 2500 et 7000 dollars / kg en fonction de la pureté. Néanmoins, il est actuellement commercialisé sous la forme d'une huile enrichie en astaxanthine (1 à 5% d'astaxanthine dans le mélange). L'un des défis de la bioraffinerie d'*H. pluvialis* concerne donc la séparation de l'astaxanthine et des lipides, aucun procédé de fractionnement des composés liposolubles n'ayant à ce jour été proposé dans le cadre d'une bioraffinerie de microalgue.

L'objectif de ce travail de thèse porte donc sur l'extraction et la caractérisation des molécules constituant la biomasse de *H. pluvialis*, le choix des opérations unitaires de fractionnement des molécules, et la valorisation possible des molécules extraites.

Ce manuscrit s'articule autour de trois chapitres. Tout d'abord la synthèse bibliographique présente l'état de l'art concernant les différents types de bioraffineries existantes, les microalgues et les composés qui les constituent, puis les différents procédés de lyse et d'extraction/purification qui peuvent être appliqués aux microalgues. Ensuite le matériel et les méthodes utilisés au cours de ce travail de thèse sont décrits. Enfin les résultats obtenus sont présentés et discutés dans le dernier chapitre, divisé en 4 grandes parties, et qui concernent la caractérisation de la biomasse, l'étude des propriétés techno-fonctionnelles des protéines, la séparation des fractions liposolubles et hydrosolubles puis le fractionnement des lipides et des pigments. Un schéma intégré de bioraffinerie de la microalgue *Haematococcus pluvialis* sera proposé en conclusion du manuscrit et les perspectives présentées.

I. Synthèse Bibliographique

1. Introduction à la synthèse bibliographique

A ce jour, les énergies fossiles détiennent le monopole dans l'approvisionnement énergétique mondial. En effet avec le pétrole, le charbon ainsi que les gaz naturels, 90% des besoins énergétiques primaires de la population mondiale sont satisfaits. Cependant au vu de l'accroissement de la population mondiale, et de l'augmentation de la consommation d'énergie, il est prévu qu'il n'y aurait plus de réserve au-delà de 2050. A cette prévision s'ajoute le poids des enjeux géopolitiques des pays fournisseurs, qui rendent difficiles la stabilité du prix des énergies fossiles. Une attention particulière portée sur l'impact environnemental des énergies fossiles montre que ces dernières participent fortement à la pollution avec l'émission des gaz à effet de serre tel que le CO₂, directement corrélée au réchauffement climatique. Ainsi, du point de vue économique, écologique et environnemental, les énergies fossiles ne sont plus les meilleures options. Il devient nécessaire de mettre en place des stratégies et de rechercher des alternatives qui pourront à la fois (Brennan et Owende, 2010; Yen *et al.*, 2013) :

- accentuer l'efficacité énergétique c'est-à-dire diminuer l'énergie utilisée par unité de produit, de procédé ou de service exécuté,
- augmenter l'utilisation d'énergie « propre » et
- stimuler l'utilisation d'énergie renouvelable.

Ce dernier point a suscité un regain d'intérêt pour la production et l'utilisation d'énergies issues du vivant : les « bioénergies ». Les bioénergies sont définies comme « une énergie renouvelable dérivée de matériel biologique récent appelé biomasse » (Dahiya, 2014). Elles sont définies comme des carburants fabriqués directement ou indirectement à partir de biomasses par la FAO. De ce fait, au cours de ces dernières décennies, trois générations de « biocarburants » ont émergé : les biocarburants de première, deuxième et troisième générations.

La première génération est produite à partir de ressources agronomiques normalement destinées à un usage alimentaire et a atteint un niveau de production industriel. Elle réduit la production de CO₂ et remplace en partie certains carburants fossiles utilisés surtout dans le domaine du transport. Le principal biocarburant de première génération est le bioéthanol. Il est produit à partir des glucides tels que le saccharose et l'amidon issus de cultures de maïs ou de canne à sucre. Un autre biocarburant de première génération est le biodiesel, obtenu à partir d'huiles végétales issues de graines de blé, de colza ou de tournesol, dont il faut privilégier l'usage pour l'alimentation humaine. De plus, l'occupation des terres cultivables, les besoins élevés en eau

et en fertilisants, les conjonctures économiques sont autant de freins environnementaux et économiques identifiés chez cette première génération.

Cette controverse entre l'alimentation et l'énergie à produire a donné naissance à la seconde génération de bioénergies. Elle est produite à partir de biomasses végétales entières mais à usage non alimentaire, de résidus de l'agriculture ainsi que de déchets de l'activité forestière. Ces matières premières sont reconnues comme étant abondantes, peu coûteuses et majoritairement lignocellulosiques. Cependant, la compétitivité économique de cette génération pour la production d'énergie n'a pas atteint le niveau commercial du fait des difficultés techniques. Le prétraitement et la conversion des matières premières lignocellulosiques en sucres sont énergivores du fait de la présence de la lignine, ceci constitue la principale entrave (Ho *et al.*, 2013). Par ailleurs, la production de l'énergie à partir de déchets de l'agriculture ne permettrait de satisfaire qu'un trop faible pourcentage de la demande énergétique mondiale (Naik *et al.*, 2010).

Les biocarburants produits à partir des microalgues sont tantôt classés dans la seconde génération tantôt dans la troisième. Ce désaccord n'occulte en rien le potentiel de ces microorganismes comme source d'énergie. Les microalgues sont des microorganismes photosynthétiques qui englobent une centaine de milliers d'espèces qu'on retrouve dans tous les écosystèmes terrestres. Elles ont la particularité de combiner certaines propriétés des plantes supérieures et des microorganismes. Ces « usines » microscopiques assimilent le carbone inorganique (CO₂) par l'intermédiaire de la réaction de photosynthèse catalysée par la lumière, et elles produisent des métabolites primaires et secondaires : des lipides, des sucres, des protéines ainsi que des pigments. Tous ces composés sont valorisables dans plusieurs secteurs tel que l'alimentaire, les industries chimiques et pharmaceutiques. En plus, les microalgues possèdent des cycles de croissance rapides par rapport aux plantes, elles sont relativement faciles à cultiver et peuvent être produites dans des conditions environnementales diverses.

Le biodiesel microalgal a l'avantage par rapport au pétrodiesel d'être exempt de soufre, de réduire l'émission de particules nocives, de monoxyde de carbone ainsi que d'oxyde de soufre tout en étant aussi performant (Lapuerta *et al.*, 2008). La production de biodiesel à partir des végétaux supérieurs ne répond qu'à 0,03% de la demande énergétique mondiale en carburant de transport. Il a été démontré que les microalgues sont capables de produire 15 à 300 fois plus d'huiles destinées à la fabrication de biodiesel. En outre, la production mobiliserait moins de terres arables qui sont principalement destinées à l'alimentation humaine. Pour un rendement équivalent en biocarburant, leur culture nécessite des surfaces 49 à 132 fois plus faibles que

pour la croissance des plantes destinées à la production de biocarburant de première génération. Pour toutes ces raisons, les microalgues sont considérées par plusieurs organisations publiques ou privées comme une matière première alternative prometteuse dans la production de biocarburants (Mata *et al.*, 2010).

En 2011, Gonzalez-Delgado et Kafarov ont publié un comparatif des teneurs en huiles, du rendement de production de biodiesel, des volumes de production, des surfaces de cultures nécessaires et du coût de production de biodiesel pour les microalgues et différentes sources végétales (Tableau 1). Malgré tous les avantages que présentent les microalgues pour la production de biodiesel, le principal obstacle au développement de la filière est le coût de production trop élevé.

Tableau 1 Comparaison des microalgues avec d'autres sources végétales pour la production de biodiesel (d'après Gonzalez-Delgado et Kafarov, 2011).

Matière première	Surface de production (m²/an/kg biodiesel)	Teneur en lipides (% de matière sèche)	Volume de production (L d'huile/ha/an)	Rendement de production de biodiesel	Coût de production (\$/L)
Soja	18	18	636	90%	0,4-0,6
Colza	12	41	974	87%	0,99
Tournesol	11	40	1070	90%	0,62
Palme	2	36	5366	95%	0,68
Ricin	9	48	1307	89%	0,92-1,56
Microalgue	0,1	50	97800	60%	3,96-10,56

On notera cependant que le prix du biodiesel est fortement dépendant de la teneur en lipides de la microalgue mais aussi de sa récolte qui compte pour 50% du prix de l'huile extraite. Il faudra aussi prendre en compte les coûts d'extraction des lipides. Un exemple de comparaison entre le pétrodiesel et le biodiesel a été faite par Chisti (2008). Le baril de pétrole est estimé à 100 \$US. Pour que le biodiesel microalgal soit compétitif, il faudrait que sa biomasse soit constituée de 55 % de lipides et qu'elle coûte moins de 340\$/tonne. Malheureusement, le coût d'une biomasse de microalgue (en prenant en compte les coûts de production et de récolte) est estimé au moins à 3000 \$/tonne. Il faudrait donc mettre à contribution la technologie afin de pouvoir baisser le prix de production des microalgues d'un facteur 10 pour le rendre compétitif. Ce calcul effectué par Chisti (2008) entre dans un scénario de valorisation partielle des microalgues. La valeur ajoutée potentielle des autres composés de microalgues exploitable dans une approche bioraffinerie permettrait certainement des conclusions beaucoup plus optimistes. En effet, l'utilisation exclusive des glucides ou des lipides des matières premières de 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème}

généralisations pour la production de bioénergie engendre des coûts de production 15 à 20 fois plus élevés que le maximum acceptable pour assurer une rentabilité économique de la filière (Batista *et al.*, 2013). Une exploitation des microalgues à des fins énergétiques nécessite donc de diminuer les coûts de production et de récolte de la biomasse, ainsi que des procédés d'extraction et de transformation des huiles en biodiesel. Cependant, une approche « bioraffinerie » permettant la valorisation de l'intégralité des composés contenus dans la biomasse est également une alternative intéressante. En effet, à titre d'exemple, le prix d'une biomasse microalgale peut atteindre 36 à 50€/kg dans le marché de la nutrition humaine et animale, alors que les composés tels que les pigments produits par certaines microalgues sont commercialisés entre 215 €/kg pour le beta-carotène et 7000 €/kg pour l'astaxanthine (Batista *et al.*, 2013).

2. Bioraffinerie : le concept

2.1. Définition et classification des bioraffineries

Le terme bioraffinerie a été défini par la « National Renewable Energy Laboratory » (NREL) comme étant « une installation composée de procédés et d'équipements nécessaires à la conversion d'une biomasse en carburant et en produits chimiques ». Elle a été classée en trois phases en fonction de la flexibilité de la matière première, de la capacité de transformation des installations et des produits fabriqués. Ces trois paramètres précités sont quasiment figés lorsqu'il s'agit d'une bioraffinerie de phase I. En effet, un seul type de matière première est utilisable et une technologie donnée permet de la transformer en un produit d'intérêt avec des rendements figés. Une bioraffinerie de phase II s'affranchit de la contrainte liée aux produits conçus, cependant les installations et la matière première sont invariables. En ce qui concerne la bioraffinerie de phase III, elle n'a aucune contrainte. Une grande variété de produits est obtenue à partir de diverses matières premières grâce à la mise en œuvre de plusieurs procédés et installations. Cette bioraffinerie a été la plus promue durant ces dernières décennies. Son objectif est de mettre en œuvre différents procédés afin de séparer les principaux composés contenus dans une biomasse et d'élaborer, en plus des bioénergies, toute une palette de produits d'intérêts. La bioraffinerie permettrait ainsi de produire des « high value low volume (HVLV) products » ou composés en « faible volume et à haute valeur ajoutée » qui accroissent la rentabilité économique, tandis que les autres composés tels que les lipides ou les sucres permettront de répondre à la demande énergétique (Chisti, 2007; Fernando *et al.*, 2006; Naik *et al.*, 2010). A ce jour, il existe trois systèmes de bioraffinerie de phase III : la bioraffinerie basée

sur la valorisation d'une plante entière (« whole crops biorefinery »), la bioraffinerie lignocellulosique (« Lignocellulosic feedstock biorefinery, LCF ») et enfin la bioraffinerie « verte ».

2.2. Bioraffinerie Plante Entière

La matière première est le plus souvent du maïs ou des céréales. Des traitements mécaniques permettent de dissocier le végétal en différents composés. Ces derniers seront traités séparément soit par des méthodes physiques, soit par des méthodes chimiques ou encore biotechnologiques (fermentation). La bioraffinerie de plantes entières permet d'obtenir des produits qui ne sont pas uniquement destinés au domaine énergétique. A partir de ses procédés sont aussi fabriqués des bioplastiques, du ciment et même des adhésifs.

2.3. Bioraffinerie Lignocellulosique

Comme son nom l'indique, cette bioraffinerie est basée sur une matière première végétale fibreuse tel que des déchets de l'industrie du bois, des « mauvaises herbes » voire des déchets de l'industrie de papeterie. La composition chimique de la matière première est donc à dominante polysaccharidique : l'hémicellulose, la cellulose et la lignine. La valorisation est orientée vers le domaine de l'énergétique qui reste la raison première de la mise en œuvre de cette bioraffinerie. Ainsi, de l'hydrogène est produite à partir de la gazéification de la matière première lignocellulosique. Un enchaînement de procédés permet de transformer la lignine ainsi que les fibres en produits destinés à la papeterie.

2.4. Bioraffinerie Verte

La bioraffinerie verte est un système multi productif qui en fonction de la physiologie de la matière première à valoriser adapte ses procédés. La matière première est le plus souvent dans un milieu aqueux, il peut s'agir d'herbes, de plantes et de graines vertes. La première étape de cette bioraffinerie consiste à récolter, puis à séparer la matière première de l'eau. On obtient ainsi un gâteau riche en fibres et une phase aqueuse riche en nutriments. Le « gâteau » ou pâte contient à la fois de la cellulose et des fibres, mais aussi des pigments et d'autres composés organiques. La phase aqueuse contient plutôt des protéines, des enzymes ainsi que d'autres substances organiques et minérales (Fernando *et al.*, 2006).

La bioraffinerie des microalgues appartient à la catégorie de bioraffinerie de phase III et peut être considérée comme de la bioraffinerie « verte ». Elle s'est inspirée du concept de raffinage du pétrole. Cet objectif peut être atteint en mettant en place une plateforme ou une succession de procédés selon le schéma ci-dessous (Figure 1). Elle est mise en place afin d'extraire et de purifier les composés d'intérêts contenus dans une microalgue donnée.

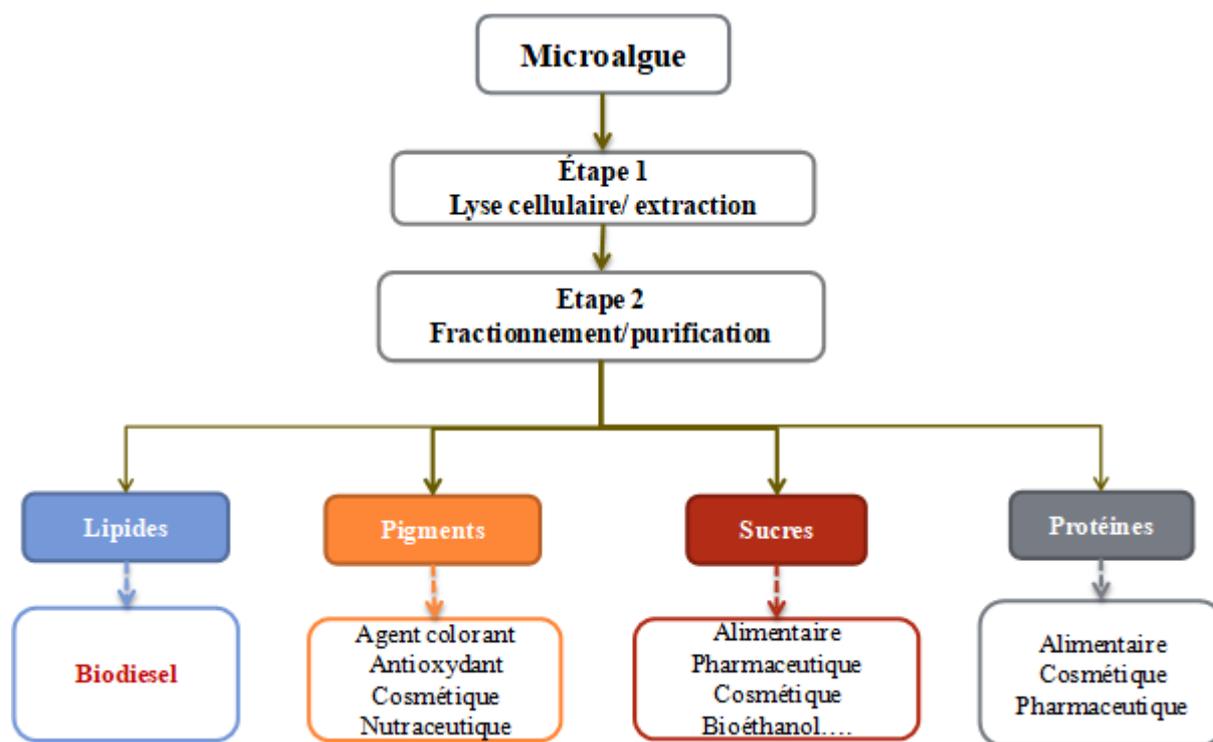


Figure 1 Schéma général d'une bioraffinerie de microalgues.

Le choix de la microalgue est important pour appliquer une démarche de bioraffinerie. Il est nécessaire d'avoir une connaissance des caractéristiques structurales et physicochimiques de la microalgue en question. La physiologie de la souche détermine le choix des procédés et la facilité de leur mise en œuvre. Sachant que l'objectif initial est bien de produire des biocarburants, la composition en sucres et/ou en lipides est importante. Un autre critère primordial est la teneur et la nature des composés non énergétiques. La présence de pigments et de protéines à haute valeur ajoutée est un plus non négligeable.

3. Microalgues

3.1. Généralités

Les microalgues sont des algues unicellulaires appartenant à un groupement polyphylétique composé d'eucaryotes capables de synthétiser la chlorophylle *a* comme pigment primaire photosynthétique. D'autres microorganismes photosynthétiques, les cyanobactéries, sont parfois assimilées aux microalgues même si elles divergent de ce groupe par le fait qu'il s'agit d'organismes procaryotes. Tous ces microorganismes photosynthétiques convertissent l'énergie lumineuse en énergie chimique et produisent des glucides à partir du dioxyde de carbone (CO₂). Les glucides servent au design cellulaire et constituent le stock énergétique des microalgues. La taille des cellules de microalgue varie entre l'unité et la centaine de microns et elles ont un système de reproduction asexué, basé sur le mécanisme de scission binaire au cours duquel une cellule mère se divise pour former deux nouvelles cellules. Elles sont entourées par une membrane plasmique qui peut être associée à une paroi polymérique, de nature polysaccharidique par exemple. Leur composition intracellulaire et membranaire est fonction du type de microalgue. Cependant elles possèdent les organites nécessaires pour produire des métabolites primaires et secondaires qu'elles accumulent au cours de leur vie. Le groupe des microalgues englobe une centaine de milliers d'espèces qui croissent et survivent le plus souvent dans des écosystèmes aquatiques. Cependant elles sont aussi présentes dans d'autres écosystèmes terrestres où elles s'adaptent à des conditions environnementales extrêmes tels que des milieux acide, basique, sec ou salé ainsi que des sources hydrothermales ou même des glaciers (De Reviers, 2003).

3.2. Classification

Les algues sont considérées comme des végétaux à la différence qu'elles ne possèdent pas de racines, ni de tiges ou de feuilles. Un autre contraste par rapport aux végétaux supérieurs est la présence d'un appareil végétatif dénommé thalle dont la structure varie en fonction de l'espèce d'algues considérée. La classification des algues repose partiellement sur leurs caractéristiques biochimiques, mais surtout plastidiales notamment la nature et la localisation des pigments ainsi que la disposition de leurs thylacoïdes. Dans la classification donnée par le code international de nomenclature botanique, les macro- et les microalgues sont réunies au sein de mêmes familles. Toujours selon De Reviers (2003), il existe 9 embranchements d'algues qui possèdent tous un pigment en commun: la chlorophylle *a*. Parmi ces 9 embranchements il existe 4 grands groupes : les algues brunes ou Pheophycées, les algues rouges ou Rhodophycées, les algues

vertes (Streptophycées et Chlorophycées) et enfin les algues bleues ou cyanobactéries. Ce dernier groupe est assimilé aux microalgues bien que n'en faisant pas partie du point de vue phylogénétique. En effet, les cyanobactéries sont des microorganismes photosynthétiques mais procaryotes et appartenant donc au règne des bactéries.

3.2.1. Algues brunes

Chez ces microalgues, les pigments verts (chlorophylles *a* et *c*) sont dominés par d'autres pigments : les carotènes et les xanthophylles. Ces Phéophycées ne possèdent pas d'amidon, leur réserve vacuolaire est composée de polysaccharides de faibles masses molaires. Elles sont pluricellulaires et de taille variable.

3.2.2. Algues rouges

Les Rhodophycées (Figure 2) sont des algues majoritairement pluricellulaires, de taille variable, eucaryotes et de couleur rouge. Elles synthétisent parfois de la chlorophylle *d* en plus de la *a* ainsi que d'autres pigments définis comme surnuméraires : la phycocyanine, l'allophycocyanine, la phycoérythrine et des caroténoïdes. Elles stockent de l'énergie sous forme d'amidon et sont connues pour leur production de polysaccharides extracellulaires (Fenoradosoa, 2009). Parmi les rhodophycées, les souches les plus connues de microalgues, unicellulaires, appartiennent au genre des *Porphyridium* ou *Rhodella*.

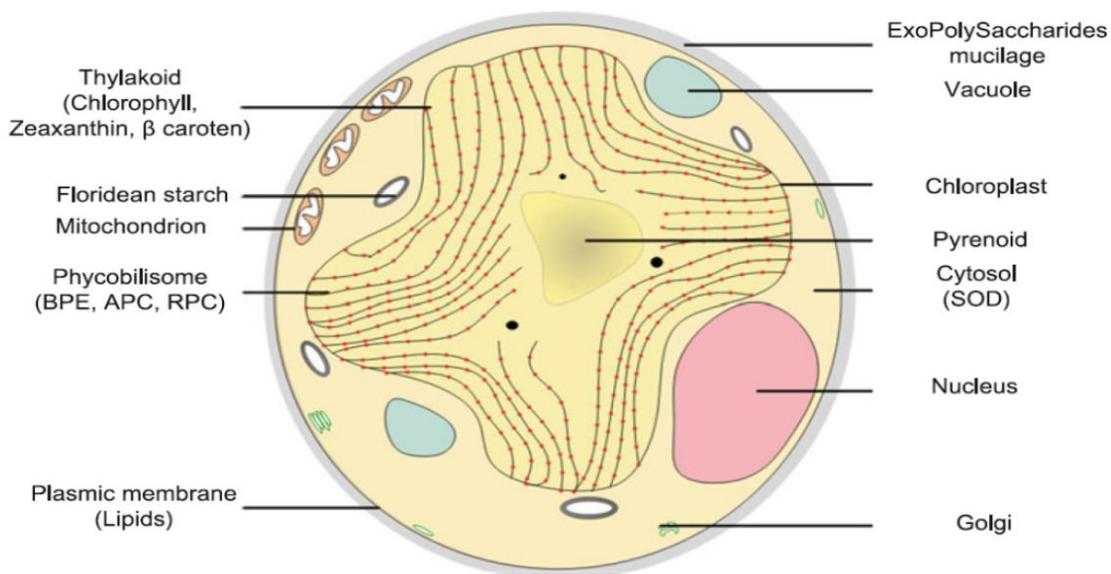


Figure 2 Ultrastructure générale des microalgues rouges (Pignolet *et al.*, 2013).

3.2.3. Algues bleues

Les cyanophyta appartiennent à un groupe de procaryotes divisé en deux grandes familles: les cyanobactéries (Figure 3) et les prochlorophytes. Ces microorganismes sont classés dans les microalgues car ils synthétisent à la fois de la chlorophylle *a* et de la chlorophylle *d*. Ils sont décrits comme bleus ou bleus verts à cause d'un pigment : la phycocyanine (De Reviers., 2003). Ils accumulent du glycogène en temps que stockage intracellulaire d'énergie (Madhavi-Shekaram *et al.*, 1987). Les microalgues bleues sont capables d'assimiler le carbone inorganique via la photosynthèse bien que la plupart d'entre elles aient également l'aptitude de croître dans un milieu sans lumière avec une source de carbone organique. Elles sont caractérisées par une grande diversité morphologique avec des espèces unicellulaires ainsi que d'autres filamenteuses que l'on retrouve à la fois dans des milieux aqueux ou terrestres. Les microalgues bleues sont principalement connues pour la synthèse de molécules ultrapériphériques visqueuses qui s'apparentent à des polysaccharides capsulaires (De Philippis et Vincenzini, 1998). L'espèce de cyanobactérie ayant fait l'objet du plus d'études à ce jour est *Arthrospira platensis*, plus connue sous le nom de spiruline à cause de sa forme en tire-bouchon.

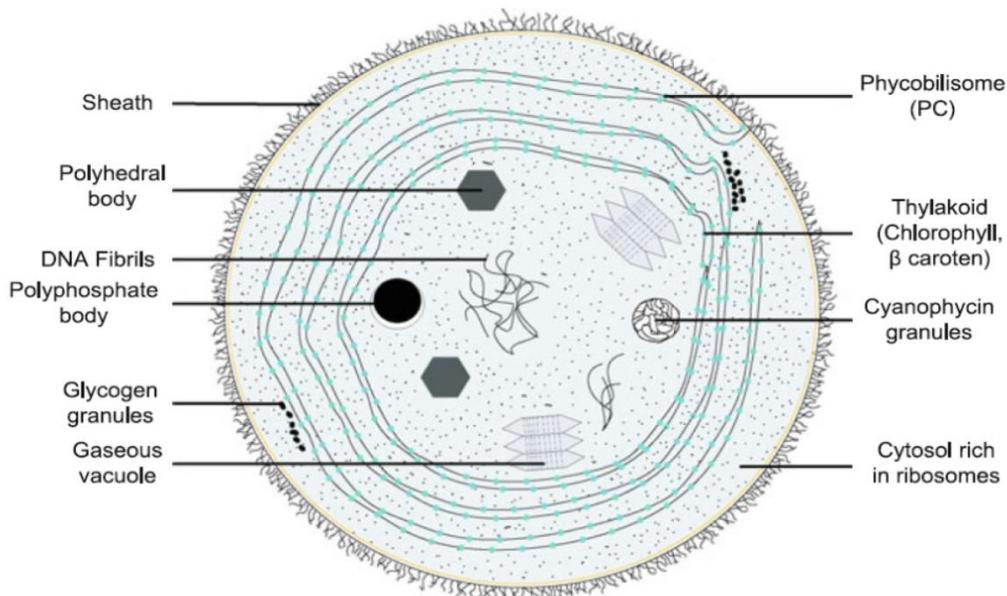


Figure 3 Ultrastructure générale des cyanobactéries (Pignolet *et al.*, 2013).

3.2.4. Algues vertes

Leur embranchement est composé de deux grands groupes appelés infrarègnes : les Streptophyta et les Chlorophyta. Ces deux infrarègnes comptent plus d'un millier d'espèces : des eucaryotes unicellulaires ou pluricellulaires. Les Streptophytes sont constitués à la fois

d'algues mais aussi de plantes terrestres appelés embryophytes tandis que les chlorophytes sont strictement composés d'algues. Leur taille varie de quelques microns à plusieurs mètres et comme leur nom l'indique, elles sont de couleur verte du fait de la synthèse des chlorophylles *a* et *b*. Certaines espèces ont des caractéristiques particulières : par exemple l'absence de paroi cellulaire. Les microalgues les plus connues appartiennent aux chlorophytes et l'on peut citer les espèces *Dunaliella*, *Chlorella*, *Botryococcus*, *Scenedesmus* ou *Chlamydomonas*. D'après Gonzales-Fernandez *et al.*, (2012) cette famille de microalgues accumule de l'amidon comme réserve intraplastidiale (Figure 4) à l'instar des plantes supérieures. Elles sont réputées pour être riches en acides gras insaturés et leur paroi cellulaire, quand elles en ont une, contient généralement de la cellulose (Thompson, 1996).

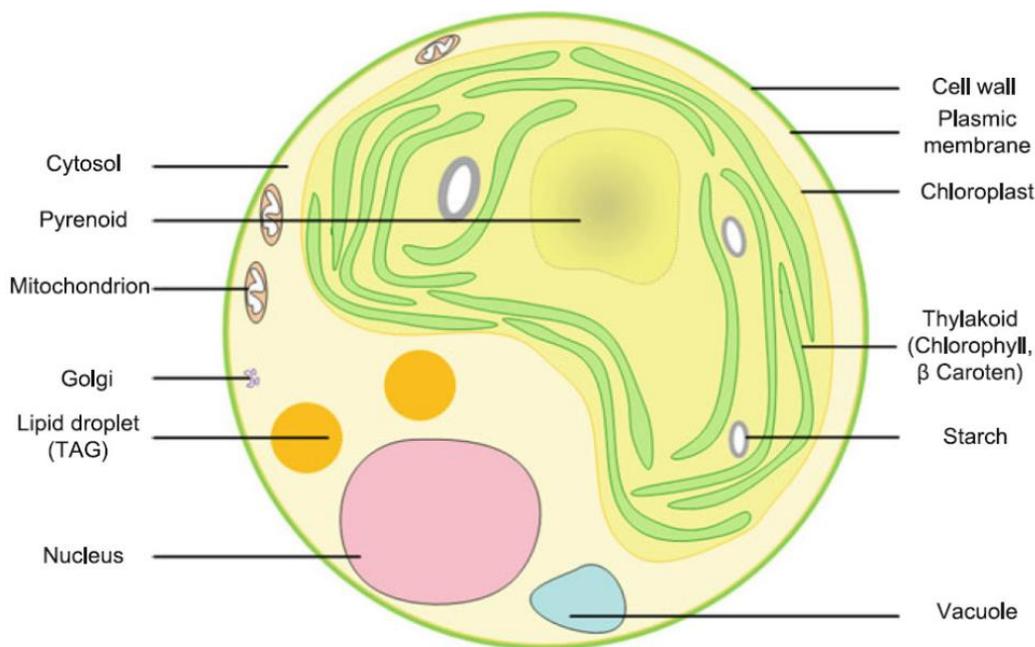


Figure 4 Ultrastructure générale des microalgues vertes (Pignolet *et al.*, 2013).

3.3. Composés d'intérêts

Les premières utilisations des microalgues concernent l'incorporation des biomasses dans l'alimentation humaine. Cela remonte à plus de 2000 ans dans la société chinoise. Depuis lors et jusqu'au début des années 50, les microalgues ont été cantonnées aux applications alimentaires. Elles ont été considérées comme des sources de protéines en réponse à la crise alimentaire et ont été valorisées en tant que nutraceutiques. Depuis la fin du XX^{ème} siècle, les microalgues sont perçues comme des sources de matières premières à destination énergétique. L'émergence du concept d'extraction et de valorisation globale appelé bioraffinerie rappelle qu'elles sont une source de matières premières remarquables grâce à leurs composés bioactifs :

protéines, sucres, lipides et pigments. Une connaissance des propriétés biochimiques de ces composés, des méthodes d'extraction ainsi que de purification sont nécessaires à la mise en place d'un procédé intégré qui aboutira à leur valorisation globale.

3.3.1. Biomasses entières

La biomasse des microalgues a d'abord été valorisée dans l'alimentation humaine. La présence des sucres, protéines, pigments, lipides, minéraux mais aussi vitamines (telles que la riboflavine, le carotène, la thiamine et l'acide folique) en sont la raison. Le Tableau 2 présente et compare les teneurs en lipides, protéines et glucides de certaines microalgues avec d'autres aliments.

Tableau 2 Teneurs moyennes en composés principaux (protéines, glucides et lipides) de quelques microalgues en comparaison avec des aliments.

Espèces	Protéines (% MS)	Glucides (% MS)	Lipides (% MS)	Références
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22	Spolaore <i>et al.</i> , 2006
<i>Arthrospira platensis</i>	63	15	11	
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6	Becker, 2007
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-19	
Viande	43	1	34	
Œuf	47	4	41	Gouveia <i>et al.</i> , 2008
Lait	26	38	28	
Soja	37	30	20	

Le Tableau 2 montre que les souches de microalgues présentées ont des teneurs en protéines supérieures ou équivalentes aux aliments. Ainsi *Porphyridium cruentum* et le soja ont des teneurs proches en protéines et en lipides avec 39% versus 37% et 19 versus 20% respectivement. En ce qui concerne les lipides et les glucides, les teneurs sont en général plus faibles que celles des aliments cités en référence. Cependant, la composition des microalgues est très variable selon l'espèce et les conditions de culture. Seules quelques rares espèces font l'objet d'une autorisation de mise sur le marché pour l'alimentation humaine : *Chlorella vulgaris*, *Arthrospira platensis* (spiruline) et *Odontella aurita*.

Elles sont actuellement produites à l'échelle industrielle et commercialisées en tant que compléments alimentaires, ou incorporées en tant qu'ingrédients dans des boissons ou des préparations culinaires (Batista *et al.*, 2011; Bellou *et al.*, 2014). D'autres souches de microalgues sont également autorisées en alimentation animale. Ainsi, *Nannochloropsis occulata* est une microalgue appartenant aux eustigmatophytes riches en acide eicosapentaénoïque un acide gras polyinsaturé essentiel. Cela lui vaut son utilisation comme aliment pour la culture de rotifères qui à leur tour l'apporte aux poissons (Spolaore *et al.*, 2006). De la même façon, la présence de pigments dans les microalgues leur vaut également une utilisation comme colorant dans l'alimentation animale. C'est le cas par exemple d'*Haematococcus pluvialis*, utilisée en aquaculture pour donner une couleur rose aux truites et saumons d'élevage.

Enfin, notons que l'utilisation de la biomasse dans une optique de valorisation énergétique est de plus en plus d'actualité. La digestion anaérobique de microalgues par des organismes bactériens permet de produire du « biométhane ». Ce gaz est la troisième source d'énergie mondiale après le pétrole et le charbon (Markou *et al.*, 2012).

En plus de l'utilisation de la biomasse sous forme entière, certains composés (lipides, pigments, glucides, protéines) peuvent être valorisés sous leur forme isolée / purifiée.

3.3.2. Lipides

Les lipides de microalgues suscitent surtout l'intérêt en tant matières premières pour la production de biocarburants. Dans le cadre d'un projet de production de biodiesel, le choix des microalgues est principalement basé sur leur teneur en lipides et sur la composition biochimique de ces derniers. Cependant, les lipides de microalgues sont des composés possédant une grande diversité biochimique. Une connaissance plus approfondie de cette diversité a montré qu'au-delà des aspects énergétiques, ils peuvent avoir des applications dans les domaines alimentaire et cosmétique.

3.3.2.1. Caractéristiques

La teneur et la nature des lipides dépendent du type de microalgue ainsi que des conditions de culture. La quantité de lipides est assez faible chez les cyanobactéries, par contre elle peut atteindre 50 voire 70 % de la biomasse sèche chez certaines microalgues eucaryotes parfois appelées microalgues oléagineuses (Hu *et al.*, 2008). Les espèces appartenant aux genres *Botryococcus*, *Dunaliella*, *Isochrysis*, *Nannochloropsis*, *Tetraselmis*, *Phaeodactylum*,

Chlorella ou *Schizochytrium* produisent généralement beaucoup de lipides (Mata *et al.*, 2010). La production de lipides est peu importante durant la phase exponentielle de croissance et atteint généralement sa valeur maximale lors de la phase stationnaire (Xu *et al.*, 2007). La modification de certains paramètres de culture, assimilable à un stress pour la microalgue, induit généralement une augmentation de la synthèse des lipides. Il peut s'agir notamment d'une carence en azote ou d'une modification (hausse ou baisse) de la température optimale de croissance. En réponse au stress, la cellule accumule plus de lipides afin de faire face à la perturbation de son environnement (Thompson, 1996). Cette réponse biologique a été observée chez *Haematococcus pluvialis* en réponse à une carence azotée, un apport excessif en luminosité ou un stress dû au phosphore. La même tendance a pu être observée en augmentant la température de culture de *Nannochloropsis oculata* ou en la privant d'azote (Converti *et al.*, 2009; Saha *et al.*, 2013).

Qualitativement, les structures biochimiques des lipides sont assez similaires chez les organismes de la même classe taxonomique. Ils sont subdivisés en différentes classes : lipides neutres et polaires, esters de cire, hydrocarbures, ainsi que certains dérivés de prényls tels que le tocophérol ou les terpènes (Hu *et al.*, 2008).

En début de croissance, les lipides de structure sont les plus représentés. Ce sont généralement des lipides polaires tels que des phospholipides et des glycolipides (lipides constitutifs des membranes cellulaires), mais également des galactolipides et des sulfolipides exclusivement localisés dans les plastides ou les thylacoïdes. On retrouve parfois des traces de sphingolipides chez certaines algues vertes dont *Scenedesmus obliquus* (Thompson, 1996). En condition de stress, les lipides produits ont une composition biochimique différente. Dans ce contexte, les microalgues synthétisent plutôt des lipides neutres, majoritairement des triacyl-glycérols (TAG) ou triglycérides, composés d'acides gras estérifiés à une molécule d'alcool : le glycérol. Ce sont des lipides de stockage, qui sont synthétisés et accumulés en grande quantité sous forme de «globule gras» dans le cytosol (Hu *et al.*, 2008). L'avancée des techniques d'analyses a permis de mettre en évidence d'autres classes de lipides moins communs. On retrouve par exemple de longues chaînes d'alcénones et des stérols chez la microalgue *Chrysothila lamellose*. Parmi les microalgues vertes, certaines (*Botryococcus*, *Scenedesmus*...) sont dotées d'une macromolécule très résistante au niveau de leur paroi et dénommée algaenane. Cette structure est principalement composée d'acides gras hydroxylés de longues chaînes (jusqu'à C40) (Guschina et Harwood, 2006; Thompson, 1996), liées entre eux par des liaisons éthers (Metzger et Largeau, 2005). La structure détaillée n'est cependant pas résolue et elle semble varier avec

la souche et les conditions d'extraction (Obeid *et al.*, 2014). Ces longues chaînes d'hydrocarbure attirent actuellement l'attention en tant que matière première pour la production de kérosène, mais également pour leur résistance et leur structure se rapprochant de celle du bitume pour la conception d'une nouvelle génération d'enrobés pour nos routes (projet ANR Algoroute).

Bien que la majorité de ces lipides soit constituée de molécules avec un nombre de carbone compris entre C14 et C22, quasiment chacune des classes de lipides précitées possède son propre profil d'acides gras (Mourente *et al.*, 1990). Ainsi, les acides gras des galactolipides sont en majorité des C16 ou des C18 polyinsaturés. Les C16 sont pour la plupart des acides gras appartenant aux lipides de structure membranaire chez les microalgues vertes, dans certains cas il s'agit des C18 (Thompson, 1996). De manière plus atypique les acides gras peuvent atteindre un nombre de carbone supérieur à 30. C'est notamment le cas des hydrocarbures de *Botryococcus braunii*. Ses acides gras ont un nombre de carbone qui oscille entre C23 et C40 ce qui leur confrère un point commun avec les acides gras contenus dans le pétrole (Metzger et Largeau, 2005), tandis que chez les alcénones, le nombre de carbone atteint 45.

Certaines souches de microalgues produisent d'importantes quantités d'acides gras mono voire polyinsaturés (AGPI) de longues chaînes (supérieure à 18 carbones) souvent greffés à des alcools. Il s'agit d'acides gras essentiels ω -3 tels que l'acide ecosapentaénoïque (EPA) (C20:5n-3) et le docosahexaénoïque (DHA) (C22:6n-3). L'ecosapentaénoïque est synthétisé en très grande quantité (90% des acides gras totaux) par une microalgue verte marine : *Chlorella minutissima*, chez l'eustigmatophyte *Nannochloropsis oculata* ainsi que chez la diatomée *Phaeodactylum tricornerum*. Cette dernière souche est d'ailleurs largement utilisée dans l'aquaculture du fait de sa production d'EPA (Harun *et al.*, 2010).

Le second acide gras essentiel, l'acide docosahexaénoïque (DHA), est produit en grande quantité par une souche de microalgue marine hétérotrophique : *Cryptocodinium cohnii* (50 % des acides gras polaires) (Jiang *et al.*, 1999). Contrairement aux acides gras ω -3 à longue chaîne qui sont plutôt abondant chez les microalgues, les ω -6 essentiels tel que l'acide arachidonique (AA) (C20:4n-6) le sont moins. L'oméga 6, l'acide docosapentaénoïque (DPA) à longue chaîne (C22:5n-6) est synthétisé par *Schizochytrium spp* (Hauvermale *et al.*, 2006). Certaines souches de microalgues synthétisent d'importantes teneurs en acides gras essentiels omégas 3 et 6. C'est le cas de la microalgue *Isochrysis galbana* et de la microalgue rouge *Porphyridium cruentum* qui accumulent des teneurs importantes d'EPA / DHA et AA / EPA, respectivement (Patil *et al.*, 2006).

3.3.2.2.Applications / valorisations des lipides

La diversité biochimique des lipides rend leurs domaines de valorisation d'autant plus variés. Les lipides contenus dans une microalgue peuvent avant tout être une matière première à la production de biodiesel. Il s'agit d'un carburant composé d'un mélange d'esters d'acides gras (EAG) issus d'une réaction de transestérification des TAGs en présence d'un alcool à courte chaîne de carbone (méthanol). Les TAGs sont simplifiés par des réactions chimiques réversibles en di- puis monoglycérides et réagissent avec l'alcool présent en excès. La transestérification décrite par la Figure 5 est souvent catalysée par un acide ou une base (NaOH) et produit du glycérol en plus du biodiesel.

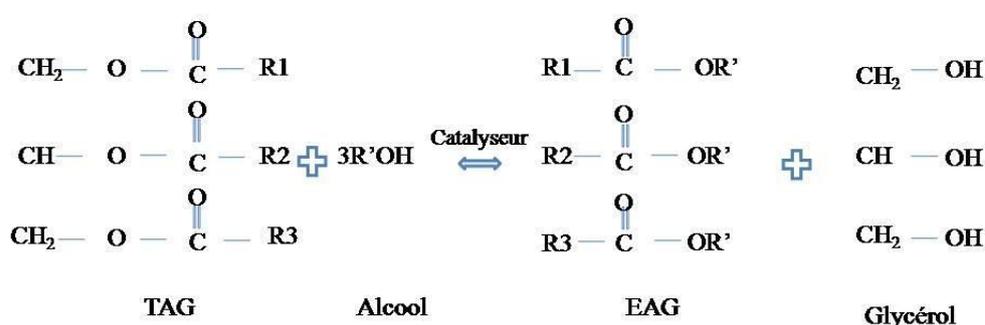


Figure 5 Production de biodiesel (mélange d'esters d'acides gras) par transestérification des triacylglycérols. Les R (1, 2 et 3) correspondent aux acides gras synthétisés par la microalgue lors de sa croissance.

Cependant tous les acides gras ne permettent pas d'envisager la production de biodiesel de microalgues. En particulier les AGPIs sont plus facilement oxydables, ce qui est un inconvénient pour la conservation du biocarburant. Par ailleurs, un ratio de 5 : 4 : 1 en acide gras C16:1, C18:1 et C14:0 respectivement a été défini comme étant optimal dans un biodiesel (Schenck *et al.*, 2008). Il permettrait de produire un biodiesel avec un faible potentiel oxydatif. Au regard de cette information, il s'avère que les microalgues comme *Botryococcus braunii* qui produisent des lipides à longues chaînes et plus saturés soient des bons candidats pour la production de biodiesel. Une autre alternative serait de saturer les AGPIs contenu dans l'huile issue d'une microalgue par l'intermédiaire d'une réaction chimique : l'hydrogénation catalytique partielle. Ce procédé provient de l'industrie pétrolière et a été adapté aux microalgues. Il consiste en une réaction de réduction qui sature les acides gras insaturés en leur ajoutant des atomes d'hydrogène. Les molécules à longues chaînes saturées obtenues sont ensuite réduites à des molécules de plus petites chaînes en présence d'un catalyseur tel que le molybdate de cobalt à haute pression (20MPa) et à haute température (340-430°C), il s'agit de

l'étape de craquage. L'hydrocarbure fabriqué est utilisé comme bioénergie à destination du transport aérien (biokérosène) (FAO, oil production, Hillen *et al.*, 1982).

L'autre application des lipides de microalgues est l'utilisation nutritionnelle et pharmaceutique des AGPIs. Ils peuvent être incorporés dans l'alimentation humaine soit en étant directement ingérés par l'Homme comme complément alimentaire ou à travers la chaîne alimentaire en passant par l'aquaculture. Les AGPIs sont également impliqués dans le traitement et la prévention de maladies telles que l'athéro-sclérose, la thrombose et certains cancers. Ils interviennent dans la croissance et la performance de certains organes humains tels que le cerveau, les yeux et maintiennent la santé cardiovasculaire (Horrocks et Yeo, 1999). Les oméga 3 (EPA et DHA) participent à la régulation de la tension artérielle (Rousseau *et al.*, 2003) ou la coagulation sanguine (Jump *et al.*, 1994). A ce jour grâce aux souches *Schizochytrium* et *Cryptothecodinium cohnii* cultivées à grande échelle aux Etats Unis, le DHA est produit et commercialisé à plus de 250 tonnes (Spolaore *et al.*, 2006). Parce que les coûts de production à l'échelle industrielle sont trop élevés, l'EPA d'origine microalgale est non compétitif par rapport aux autres sources d'EPA. Les coûts doivent être réduits d'au moins 80 % afin de concurrencer les prix actuels (Bellou *et al.*, 2014 ; Molina Grima *et al.*, 2003).

3.3.3. Pigments

Les pigments sont parmi les composés d'intérêts synthétisés par les microalgues. Ils confèrent une coloration à un organisme donné et sont utilisés comme des marqueurs taxonomiques et phylogénétiques. Compte tenu de leur valeur ajoutée ils occupent une place de choix dans la valorisation de la biomasse de microalgue.

3.3.3.1. Caractéristiques

Il existe 5 classes de pigments connues à ce jour :

- Les chlorophylles,
- Les caroténoïdes,
- Les xanthophylles,
- Les phycobiliprotéines,
- Les cytochromes.

Les xanthophylles sont parfois classées parmi les caroténoïdes. Ainsi on se retrouve avec 4 classes dont trois (chlorophylles, caroténoïdes et phycobiliprotéines) font davantage l'objet des études. Les pigments auraient pour rôle principal d'être le siège de la photosynthèse.

Néanmoins, on leur attribue également le rôle de protecteur des sièges de la photosynthèse contre la photosensibilisation. Ce sont le plus souvent des molécules à longues chaînes de carbones qui sont polaires ou apolaires (Barsanti et Gualteri, 2014).

Les pigments peuvent être classés en pigments principaux (chlorophylles) et en pigments surnuméraires. Les pigments surnuméraires (ou accessoires) permettent d'élargir le spectre d'absorption des organismes dans des régions de spectre différentes de celles de la chlorophylle (Figure 6).

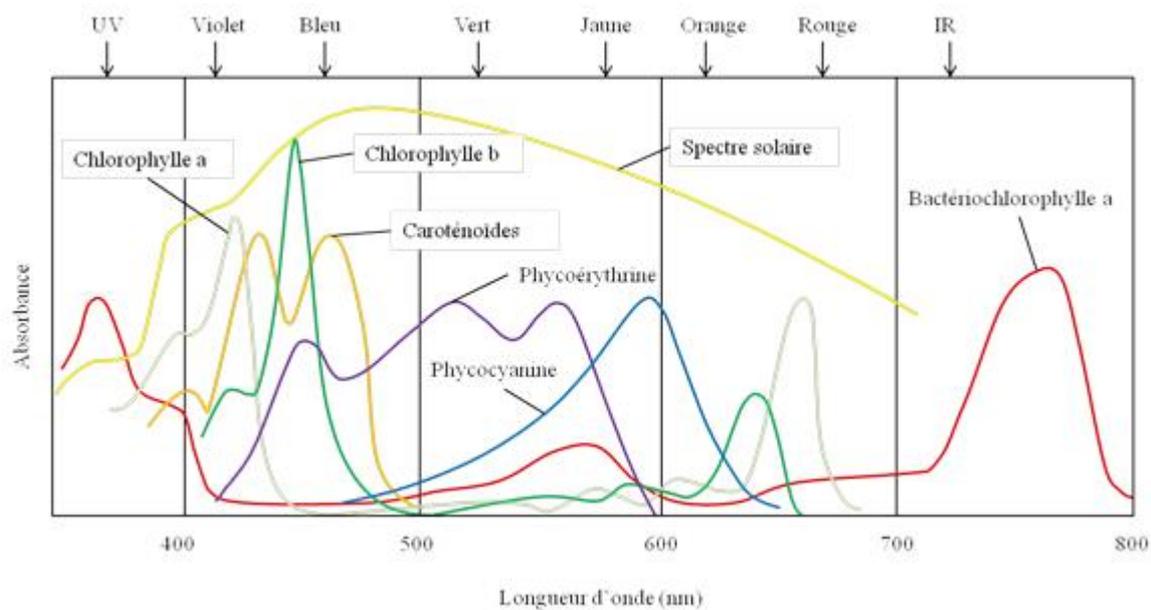


Figure 6 Spectres d'absorption des principaux pigments photosynthétiques (Voet et Voet, 2005).

Cette caractéristique permet une adaptation des organismes aux conditions d'irradiance. Les caroténoïdes et les chlorophylles absorbent dans des gammes de longueurs d'ondes de 350 nm à 550 nm (bleu-violet) et de 600 nm à 700 nm (rouge). Les phycoblines absorbent entre 450 et 700 nm (verte, jaune et orange).

3.3.3.2. Chlorophylles

Les chlorophylles sont des pigments verts au nombre de 6 (*a, b, c₁, c₂, d et f*) et dont les structures chimiques sont assez proches. Les chlorophylles sont constituées d'un noyau tétrapyrrole variablement substitué par des groupements carbonés (méthyle, aldéhyde) et construit autour d'un atome de magnésium. Exceptés les chlorophylles *c*, qui ne sont composées que d'une tête hydrophile, la porphyrine, les autres chlorophylles ont toutes en supplément une queue hydrophobe (phytol) (Figure 7). Ce sont ces conjugaisons, présentes sur le squelette

tétrapyrrolique qui déterminent les différentes caractéristiques spectrophotométriques des chlorophylles et leur confèrent une forte absorption dans le visible (400-800 nm). En effet, elles absorbent sélectivement la lumière dans les régions rouge et bleue, émettant ainsi la couleur verte qui les caractérise. La chlorophylle *a* est la plus ubiquitaire des six formes, on la retrouve chez tous les végétaux ainsi que les microalgues. La chlorophylle *d* est localisée chez les algues rouges tandis que la *c* et la *b* sont synthétisées par les algues d'eau douce. Ce sont les molécules principales de la photosynthèse durant laquelle elles captent la lumière et la transforment en énergie chimique. Le genre *Chlorella* et *Arthrospira* (spiruline) de même qu'*Haematococcus*, sont connus pour leur richesse en chlorophylles. En effet chez *Chlorella sp.* la teneur peut atteindre 7 % de la masse sèche de sa biomasse contre 1,15 % chez la spiruline et 2 % chez *H. pluvialis*. (www.oilgae.com)(Hosikian *et al.*, 2010).

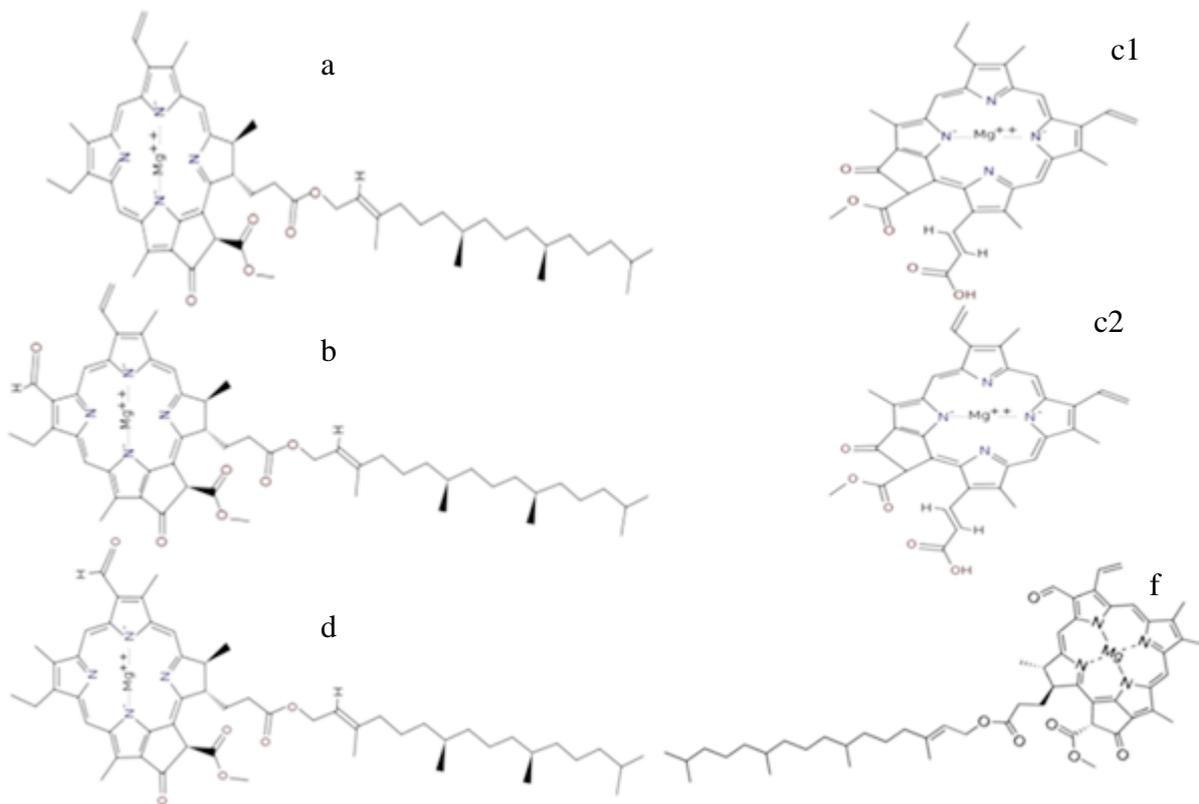


Figure 7 Les chlorophylles *a, b, c* (1 et 2), *d* et *f*.

3.3.3.3. Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des tétraterpénoïdes lipophiles constitués d'une longue chaîne carbonée principale. La chaîne carbonée est composée d'un nombre de carbone généralement égal à 40 et dans laquelle s'alternent des liaisons simples et doubles. Ce groupe de pigments contient plus de 600 molécules identifiées dans la nature qui confèrent la couleur jaune, rouge ou orange aux organismes qui les contiennent, grâce à leurs doubles liaisons qui se comportent comme des chromophores (Campo *et al.*, 2007). Il existe des isomères sous forme *trans* dans la nature et parfois sous forme *cis*, la première forme étant la plus stable des deux. Les caroténoïdes que l'on appelle primaires interviennent dans la photosynthèse et sont des composés de structures et fonctionnels. Ils sont impliqués dans la communication intracellulaire et sont essentiels à la survie de la microalgue. On les retrouve le plus souvent accrochés à la membrane cellulaire ou stockés dans les thylacoïdes (Jin *et al.*, 2003). Les caroténoïdes secondaires sont plutôt des composés de protection notamment contre la photooxydation. Ils sont synthétisés en grande quantité en réponse à des stimuli tels qu'un stress induit. Ils sont localisés dans des vésicules lipidiques à l'instar de l'astaxanthine synthétisée chez *Haematococcus pluvialis* (Guedes *et al.*, 2011; Peled *et al.*, 2011).

Les caroténoïdes sont divisés en deux groupes distincts en fonction de leur groupement chimique: les carotènes et les xanthophylles. Les carotènes sont des « hydrocarbures » uniquement composés de carbone et d'hydrogène. Les principaux carotènes connus sont le lycopène, l'alpha et le beta-carotène (Figure 8). Les xanthophylles quant à eux possèdent en plus au moins un atome d'oxygène. Ce dernier peut être sous forme hydroxyl comme chez la lutéine, en oxi-groupe chez la cantaxanthine ou encore une combinaison de ces deux formes comme on le retrouve chez l'astaxanthine. Ils en existent d'autres qui sont souvent des intermédiaires dans la caroténogénèse (Figure 9) (Guedes *et al.*, 2011; Jin *et al.*, 2003).

Le β -carotène est le caroténoïde principal de l'embranchement des chlorophytes (algues vertes). Chez la classe des *chlorophyceae*, l' α -carotène est présent comme second caroténoïde majeur. Ainsi, *Dunaliella salina* algue verte de la classe des *chlorophyceae* est la référence en synthèse de β -carotène à l'échelle industrielle (14 % de la biomasse sèche). La distribution des xanthophylles montre que la lutéine, la néoxanthine, la violaxanthine ainsi que la zéaxanthine sont les caroténoïdes majeurs chez les microalgues en général. La zéaxanthine est davantage présente chez les algues rouges alors que le reste des xanthophylles se retrouve plutôt chez les algues vertes (Takaichi, 2011).

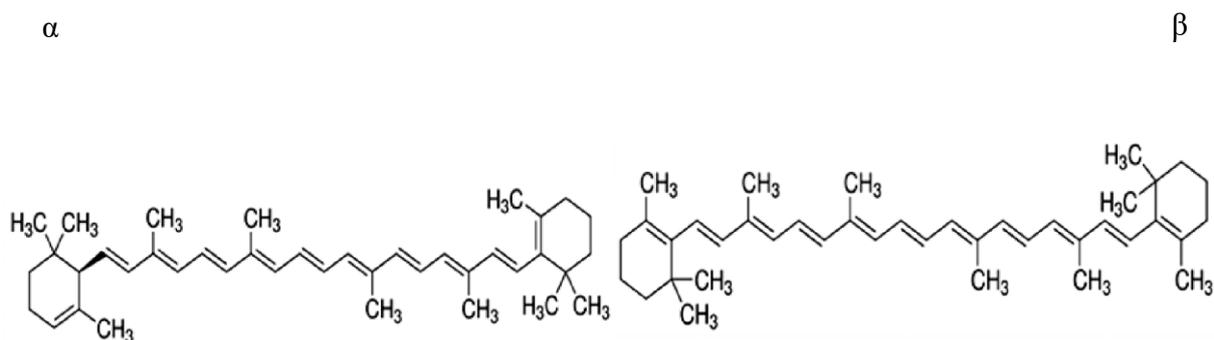


Figure 8 Les alpha (α) et beta (β) carotènes (Jin *et al.*, 2003).

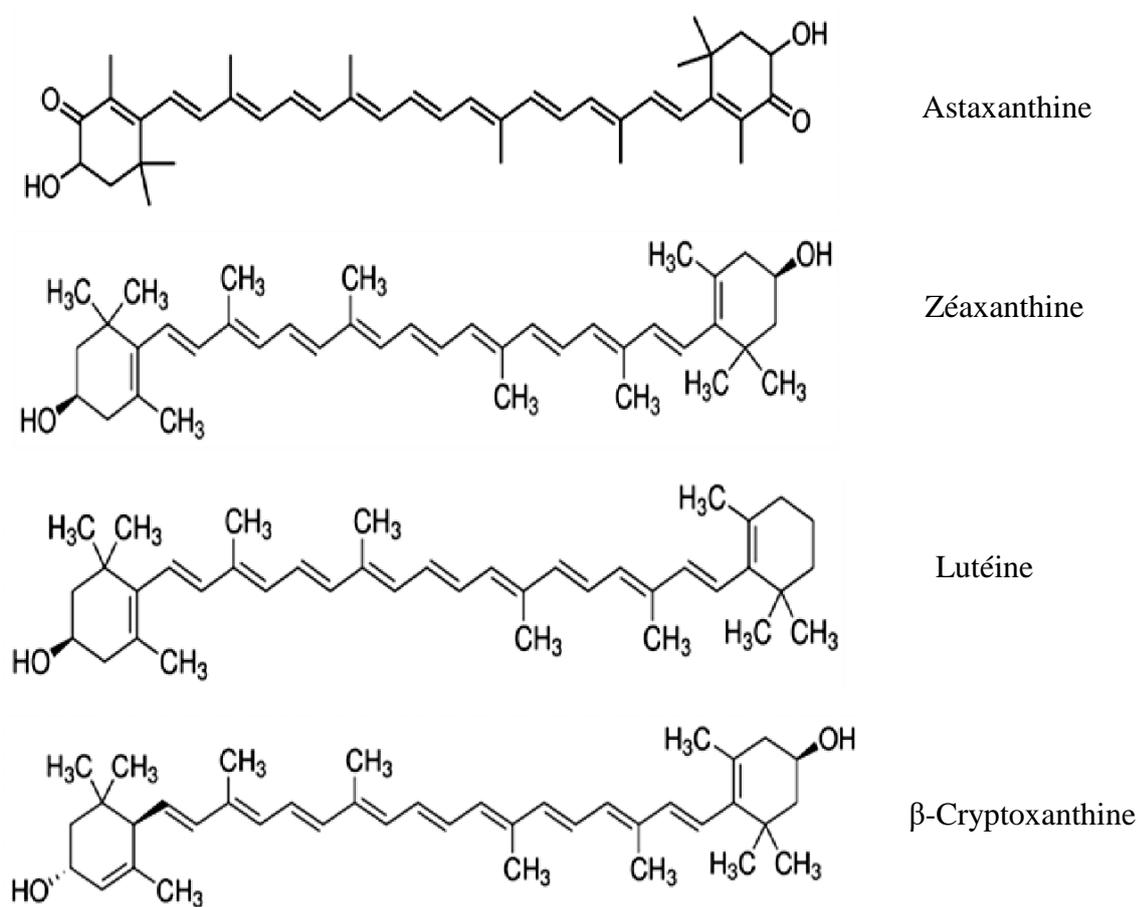


Figure 9 Les principaux caroténoïdes xanthophylles : Astaxanthine, Zéaxanthine, β -cryptoxanthine et Lutéine (Jin *et al.*, 2003).

3.3.3.4. Phycobiliprotéines

Les phycobiliprotéines (PBP) sont des pigments accessoires que l'on retrouve chez les algues rouges ou les cyanobactéries. Elles interviennent dans la réaction photosynthétique en

s'associant à d'autres pigments chlorophylliens dans des conditions de stress. Contrairement aux chlorophylles et aux caroténoïdes localisés dans les thylacoïdes, les PBP sont des composés intracellulaires qui se regroupent sous forme d'agrégat complexe appelé phycobilisome (Pignolet *et al.*, 2013). Elles sont formées d'un tetrapyrrole associé à des polypeptides par une liaison covalente. Elles peuvent atteindre 24 % de la matière sèche de la biomasse des cyanobactéries et constituer à elles seules jusqu'à 60 % des protéines hydrosolubles totales. Ces chromoprotéines hydrophiles bleues, rouges ou violettes ont des maxima d'absorption qui s'étendent de 500 à 660 nm. Les PBPs sont fluorescentes et sont classées en 3 grands groupes : les phycoérythrine (PE), les phycoérythrocyanines (PEC) et les phycocyanines (PC). Les microalgues rouges appartenant au genre *Porphyridium* sont reconnues comme étant l'une des principales sources de la B-phycoérythrine (BPE) estimé entre 32 et 42 % de la biomasse de *P. cruentum* (Bermejo Román *et al.*, 2001; 2002). Il s'agit de la PBP dominante chez *Porphyridium cruentum*, qui contient néanmoins de l'allophycocyanine (5 %), de la R-phycoyanine (11 %) ainsi qu'une variante de la B-phycoérythrine : la b-phycoérythrine. La B-phycoérythrine est composé de 3 sous unités et totalise un poids moléculaire de 236 kDa, tandis que la b-phycoérythrine est composée de 2 sous unités, possède un poids moléculaire qui varie de 40 à 260 kDa. En outre elles absorbent à des longueurs d'onde distinctes (Glazer et Cohen-Bazire, 1971). La spiruline est la cyanobactérie de référence lorsqu'il s'agit de la production de phycocyanine, qui représente environ 20 % de sa biomasse totale (Sarada *et al.*, 1999). Elle contient également de l'allophycocyanine et de la phycoérythrine qui ont été estimés par Patel *et al.*, (2005) à 3,8 et 1,2 % de la biomasse sèche respectivement.

3.3.3.5. Applications / valorisations des pigments

Les pigments sont utilisés pour améliorer les produits issus de l'aquaculture. Dans ce contexte, l'astaxanthine est connue pour son utilisation dans l'alimentation des saumons et des truites auxquels il apporte la coloration orange. Bien que la forme synthétique soit plus utilisée à ce jour, l'astaxanthine synthétisée par *Haematococcus pluvialis* est autorisée comme source de caroténoïdes pour l'alimentation des saumons au Canada et au Japon. On les retrouve également dans l'alimentation humaine comme agent colorant naturel (Rebellos Fuentes *et al.*, 2000). A titre d'exemple, les caroténoïdes tels que l'astaxanthine et le β -carotène sont ajoutés dans les jus d'orange tandis que les chlorophylles et la phycocyanine accentuent la coloration de chewing-gums ou de bonbons. Les pigments naturels sont en général plus chers que leurs homologues synthétiques. Par exemple le prix du β -carotène peut atteindre 700 €/kg soit deux fois plus que celui de son homologue synthétique.

Cependant les propriétés antioxydantes des caroténoïdes naturels ainsi que la présence des isomères cis et trans expliquent leur préférence par rapport aux pigments synthétiques notamment dans le domaine nutraceutique (Guedes *et al.*, 2011).

Les PBP représentent un marché global estimé à 50 millions de dollars. En cosmétique ils sont utilisés dans la formulation de gammes de maquillage (Rebeloso Fuentes *et al.*, 2000), ou comme marqueurs fluorescents dans les immuno-tests diagnostiques dans le domaine médical (Mihova *et al.*, 1996). Les pigments ont aussi des activités biologiques. Par exemple la chlorophylle, qui est un agent chélatant, peut être utilisée comme traitement dans les ulcères pour la régénération des tissus du foie (Harun *et al.*, 2010).

Ces dernières années les domaines d'application des pigments se sont diversifiés, expliquant le nombre croissant d'entreprises produisant ces colorants naturels (Chacón-Lee et González-Mariño, 2010; Guedes *et al.*, 2011; Spolaore *et al.*, 2006).

3.3.4. Glucides

Les glucides sont les molécules biologiques les plus abondantes chez les organismes vivants. Leur grande diversité biochimique leur confère des propriétés physico-chimiques et biologiques variées. De ce fait, les glucides de microalgues ont émergé ces dernières années comme sources de composés bioactifs.

3.3.4.1. Caractéristiques

Les unités de base des glucides sont appelés monosaccharides ou oses. Les monosaccharides peuvent être reliés entre eux par des liaisons O-glycosidiques et le nombre d'unités constitutives permet de déterminer le degré de polymérisation (Dp) de ces polymères afin de les classer en deux catégories : les oligosaccharides composés de 2 à 10 monosaccharides et les polysaccharides constitués de plus de 10 monosaccharides. Certains polysaccharides sont synthétisés et stockés dans la cellule en tant que molécules de structure de la paroi cellulaire ou comme réserve énergétique. D'autres oligo ou polysaccharides sont impliqués dans les processus de communication cellulaire. Ils sont parfois liés à des protéines (glycoprotéines) ou des lipides (glycolipides).

Les polysaccharides sont la forme dominante de glucides chez les microalgues allant jusqu'à 96 % des glucides totaux. Ils sont localisés dans la paroi cellulaire ou dans la matrice intercellulaire de la microalgue (Brown, 1991). Les microalgues du genre *Dunaliella*, *Scenedesmus* et *Spirulina* ont des teneurs en glucides pouvant atteindre 45 voire 70% de leur

poids sec (De Philippis *et al.*, 1992). Cette valeur dépend de la souche et des conditions de culture. Ainsi, la limitation en azote a été employée comme un moyen d'induire la synthèse de polysaccharides chez l'espèce *Chlorella vulgaris*. En condition de stress, ce sont les polysaccharides de réserve qui sont davantage synthétisés: l'amidon ou le glycogène (Dragone *et al.*, 2011).

Les polysaccharides peuvent être classés selon leur emplacement et leur rôle au sein de la cellule algale. Les polysaccharides intracellulaires sont le plus souvent ceux de réserve. Les cyanobactéries synthétisent du glycogène, polymère de glucane liés en β 1-4, que l'on retrouve sous forme de granules. Les chlorophytes stockent plutôt de l'amidon, composé d'amylose et d'amylopectine, au niveau intraplastidial. Chez les rhodophytes, l'amidon est dit floridéen (hydride entre le glycogène et l'amidon), et se retrouve sous forme de grains dans le cytoplasme. Les microalgues accumulent de l'amidon afin de constituer une réserve de carbone. Cette accumulation n'est pas identique pour toutes les espèces de microalgues. Il existe des algues qui accumulent de grandes quantités d'amidon telles que *Chlorella vulgaris* qui peut accumuler de l'amidon à hauteur de 38-48% de sa masse sèche (culture carencée en azote) (Brányiková *et al.*, 2011), *Chlamydomonas reinhardtii* qui stocke 35 à 58 % d'amidon (biomasse sèche, culture mixotrophique) et *Tetraselmis subcordiformis* qui accumule jusqu'à 35% d'amidon (biomasse sèche) (Yao *et al.*, 2012).

Les polysaccharides fibrillaires et matriciels sont plutôt localisés dans l'enveloppe cellulaire (paroi, membrane, matrice intercellulaire) (Brown, 1991). La composition en monosaccharides de ces polymères est généralement complexe, avec 5 à 10 monosaccharides constitutifs. Les principaux sont le galactose, le glucose, le mannose, le xylose, le rhamnose, le fucose, mais également des monosaccharides acides tels que les acides glucuroniques et galacturoniques (Harun et Danquah, 2011). Par ailleurs, ces monosaccharides sont fréquemment substitués par des groupements sulfates, acétates, méthyles ou pyruvates.

Les polysaccharides fibrillaires sont localisés dans la paroi cellulaire. Ils forment le squelette de la cellule, maintenant sa structure et la protégeant contre l'hydrodynamisme de son habitat naturel. La cellulose et l'hemicellulose ont été reportées comme étant les principaux composants de la paroi cellulaire des microalgues. Ce sont majoritairement des polymères de glucoses liés en β -(1,4) ou β -(1,3). Néanmoins, en fonction des espèces, d'autres polysaccharides participent à la structuration de la paroi cellulaire, tels que les xylanes (polymères de xylose) ou les mannanes (polymères de mannose) (Kornprobst, 2005). Cependant cette structure pariétale est absente chez les microalgues rouges. Des

polysaccharides matriciels, souvent sulfatés (PSs), encapsulent les cellules dans un mucilage. Ils peuvent être partiellement relargués dans le milieu de croissance et s'y solubiliser, dans ce cas ils sont appelés exopolysaccharides (EPS). Les EPS de microalgues rouges sont souvent des hétéropolymères constitués majoritairement de galactose, de glucose, de xylose et d'acide glucuronique comme chez *Porphyridium* ou *Rhodella* (Villay *et al.*, 2013 ; Soanen *et al.*, 2016). Chez les microalgues vertes et les cyanobactéries, les polysaccharides extracellulaires restent majoritairement ancrés à la paroi / membrane externe. On parle alors de polysaccharides capsulaires (Delattre *et al.*, 2016). Il faut noter que la composition des polysaccharides de structure varie de façon drastique en fonction des conditions de culture (Hu, 2004).

3.3.4.2. Applications/ valorisations des glucides

De nombreuses activités biologiques des polysaccharides sulfatés de microalgues ont été démontrées, laissant entrevoir de nombreuses applications dans le domaine de la santé et de la pharmaceutique. Ainsi, les polysaccharides d'*Arthrospira platensis* ainsi que ceux de *Porphyridium* ont un effet inhibiteur sur certains virus (herpès, influenza) (Chen *et al.*, 2016; Huheihel *et al.*, 2002). Cette activité biologique est attribuée à leur nature anionique et à la présence de groupements sulfates. Ils possèdent des propriétés antiradicalaire et antioxydante notamment contre l'oxydation d'acides gras tels que l'acide linoléique. Cette dernière propriété est corrélée positivement à la teneur en sulfate et négativement à la masse molaire chez *Porphyridium cruentum*. Les microalgues chlorophytes ont aussi des polysaccharides d'intérêts pharmaceutiques. C'est le cas du β -(1-3)-glucane, polysaccharide pariétal de *Chlorella vulgaris*, qui possède des propriétés antitumorales (Contreras *et al.*, 2015). L'EPS produit par *Haematococcus lacustris* serait un stimulateur d'immunité d'après les travaux de Park *et al.*, (2011). D'autres propriétés thérapeutiques des polysaccharides de microalgues sont reportées dans la littérature telles que des effets anticoagulant, anticancéreux, hypoglycémiant et hypocholestérolémiant (De Jesus Raposo *et al.*, 2013).

En alimentaire, les polysaccharides sont de bons agents fonctionnels déjà utilisés en tant qu'agent gélifiant, épaississant ou stabilisant. C'est le cas de l'agar ou des alginates qui sont des polysaccharides de macroalgues. Les polysaccharides des microalgues du genre *Rhodella* et *Porphyridium* permettent aussi d'augmenter la viscosité lorsqu'ils sont présents à faible concentration dans une solution aqueuse (Geresh *et al.*, 2002). Leur comportement rhéofluidifiant pourrait les rendre intéressants dans certaines applications alimentaires voire cosmétique.

Enfin, les polysaccharides de microalgues ne présentant pas d'activités biologiques ou rhéologiques particulières peuvent être valorisés via la production de biocarburant par fermentation anaérobique. En effet, la saccharification (ou hydrolyse des polysaccharides) suivie d'une étape de fermentation, permet la production de bioéthanol. La mise en œuvre des microalgues par rapport à des matières premières lignocellulosiques est plus avantageuse. Ces dernières contiennent de la lignine et de l'hemicellulose, glucides récalcitrants à la l'hydrolyse, qu'elle soit chimique ou enzymatique. Les polysaccharides de microalgues sont plus sensibles à l'hydrolyse, facilitant ainsi la mise en œuvre de la fermentation. Pour une production de bioéthanol commerciale et compétitive, il est cependant nécessaire de mettre au point et d'optimiser des méthodes d'hydrolyse et de fermentation adaptés aux glucides microalgaux (Markou *et al.*, 2012).

3.3.5. Protéines

Actuellement très peu d'informations sont disponibles sur la cartographie des protéines de microalgues. La teneur en « protéines brutes » des microalgues, déterminée à partir du facteur azote-protéines (FAP), varie entre 6 et 70 % en fonction des espèces et des conditions de croissance (Becker, 2007; Wang *et al.*, 2010). Les protéines de microalgues ont des fonctions diverses (enzymes, transport, signalisation cellulaire). Elles sont notamment impliquées dans la photosynthèse, la respiration mitochondriale ainsi que dans tous les cycles métaboliques (carbone, azote, etc). A titre d'exemple la Rubisco (Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase / oxygenase) est l'une des protéines enzymatiques majeures de la photosynthèse et peut représenter une part significative des protéines végétales. De même, les phycobiliprotéines dont la fonction est d'assurer la collecte des photons lors de la photosynthèse donnent une couleur rouge caractéristiques à certaines microalgues marines de par leur présence à des taux significatifs (microalgues rouges).

En terme d'intérêt, on peut classer dans un premier temps les protéines des microalgues comme agent nutritionnel chez l'homme mais également chez l'animal (Safi *et al.*, 2012 ; Becker, 2007). En effet, leur composition en acides aminés est particulièrement intéressante d'un point de vue nutritionnel (Tableau 3).

Tableau 3 Profils des acides aminés de certaines microalgues comparés aux recommandations de la FAO, de soja et d'œuf.

Acides Aminées	FAO	Sources					
		Soja	Œuf	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Porphyridium cruentum</i>	<i>Nannochloropsis Oculata</i>	<i>Arthrospira platensis</i>
Isoleucine*	4	5,3	6,6	0,1	5,3	0,1	0,12
Leucine*	7	7,7	8,8	6,9	5,8	8,1	7
Valine*	5	5,3	7,2	2,9	2,5	3,3	2,9
Lysine*	5,5	6,4	5,3	6,3	5,5	5,7	5,1
Phénylalanine*	6	5	5,8	5,4	5	5,1	4,8
Tyrosine		3,7	4,2	7,8	4,4	3,4	4,8
Méthionine*	3,5	1,3	3,2	0,6	2,8	1,5	1,7
Cystéine		1,9	2,3	0,2	0,3	0,2	0,2
Tryptophane*	1	1,4	1,7	2	1,4	1,2	1,2
Thréonine*	–	4	5	5,6	6,3	5,9	6,2
Alanine		5	–	10	6,7	10,9	9,9
Arginine		7,4	6,2	6,8	7,8	5,9	7,7
acide aspartique		1,3	11	10,1	11,2	9,1	11,8
acide glutamique		19	12,6	8,4	8,2	10,3	10,5
Glycine		4,5	4,2	7,9	6,9	9	7,8
histidine		2,6	2,4	1,2	1,1	0,9	0,9
Proline		5,3	4,2	2,7	2,5	4,2	2
Sérine		5,8	6,9	7,2	8,1	6,5	6,9
Références		FAO 1977	Becker, 2007		Safi <i>et al.</i> , 2012		

A titre d'exemple, les extraits protéiques issus de *Chlorella vulgaris*, une microalgue verte, ont permis la préparation d'un extrait protéique contenant 38 % d'acides aminés essentiels (Ursu *et al.*, 2014).

Bien que très peu étudiées pour leurs propriétés techno-fonctionnelles, les protéines de microalgues peuvent être considérées comme des agents de surface et de texture. Ainsi, des extraits protéiques issus d'*Arthrospira platensis*, de *Tetraselmis suecica* et de *Chlorella vulgaris* ont montré un pouvoir émulsifiant comparable à celui des ingrédients de référence tels que ceux apportés par un isolat protéique de soja ou du caséinate de sodium (Schwenzfeier *et*

al., 2013; Ursu *et al.*, 2014, Benelhadj *et al.*, 2016). Le caractère hydrophile de ces protéines leur confrère également une bonne capacité d'hydratation et de rétention d'eau dans des formulations alimentaires et cosmétiques. Ces protéines seules ou associés à une fraction polysaccharidique naturellement présente dans les microalgues sont de bons agents de texture notamment pour stabiliser des émulsions simples ou foisonnées.

Une autre caractéristique qui mérite l'attention est leur pouvoir antioxydant notamment en substitution aux antioxydants de synthèse. Un peptide extrait de *Chlorella vulgaris* a un pouvoir antioxydant supérieur à celui d'un antioxydant synthétique (Sheih *et al.*, 2009 ; 2010). Ces protéines sont également présentes dans la structure de certains pigments à haute valeur ajoutée (phycobiliprotéines) utilisés notamment pour leur pouvoir antioxydant.

Tous ces composés cellulaires sont de potentielles matières premières pour l'élaboration de produits, parfois à haute valeur ajoutée. Si les lipides ont pour principal débouché la production de biodiesel, les domaines d'applications des autres molécules, actuels et à venir, sont très variés (alimentation humaine et animale, pharmaceutique, cosmétique...). La mise au point de méthodes d'extraction et de purification adaptées à ces composés est donc cruciale dans la démarche de bioraffinerie.

4. Extraction des composés d'intérêt

Compte-tenu de la diversité physiologique des microalgues, entre autre la présence ou non de paroi cellulaire et la rigidité de cette dernière, il est parfois nécessaire de fragiliser la cellule afin de libérer les composés intracellulaires. Cette étape appelée lyse cellulaire est une étape préliminaire et parfois indissociable à celle de l'extraction. Lors de la phase de lyse, l'extraction peut prendre place avec l'ajout du solvant, permettant ainsi de lier les deux.

Dans la suite de cette section, les principales méthodes de lyses cellulaires seront présentées. Une attention particulière sera accordée à celles qui sont les plus utilisées à ce jour. L'accent sera aussi mis sur les méthodes et les solvants dits « verts » respectueux de l'environnement. L'efficacité des méthodes, leur extrapolation à l'échelle industrielle ainsi que leur coût seront aussi présentés.

4.1. Méthodes de lyse cellulaire

Il existe plusieurs méthodes de lyse, séparables en deux grands groupes : les mécaniques et les non mécaniques, ces dernières étant subdivisées en méthodes physiques, chimiques et enzymatiques (Figure 10).

Le choix de la méthode prend en compte plusieurs paramètres :

- la physiologie de la cellule cible, par exemple la rigidité de la paroi cellulaire,
- l'efficacité de la méthode,
- la consommation énergétique et plus généralement le coût,
- et enfin la possibilité d'une extrapolation à l'échelle industrielle.

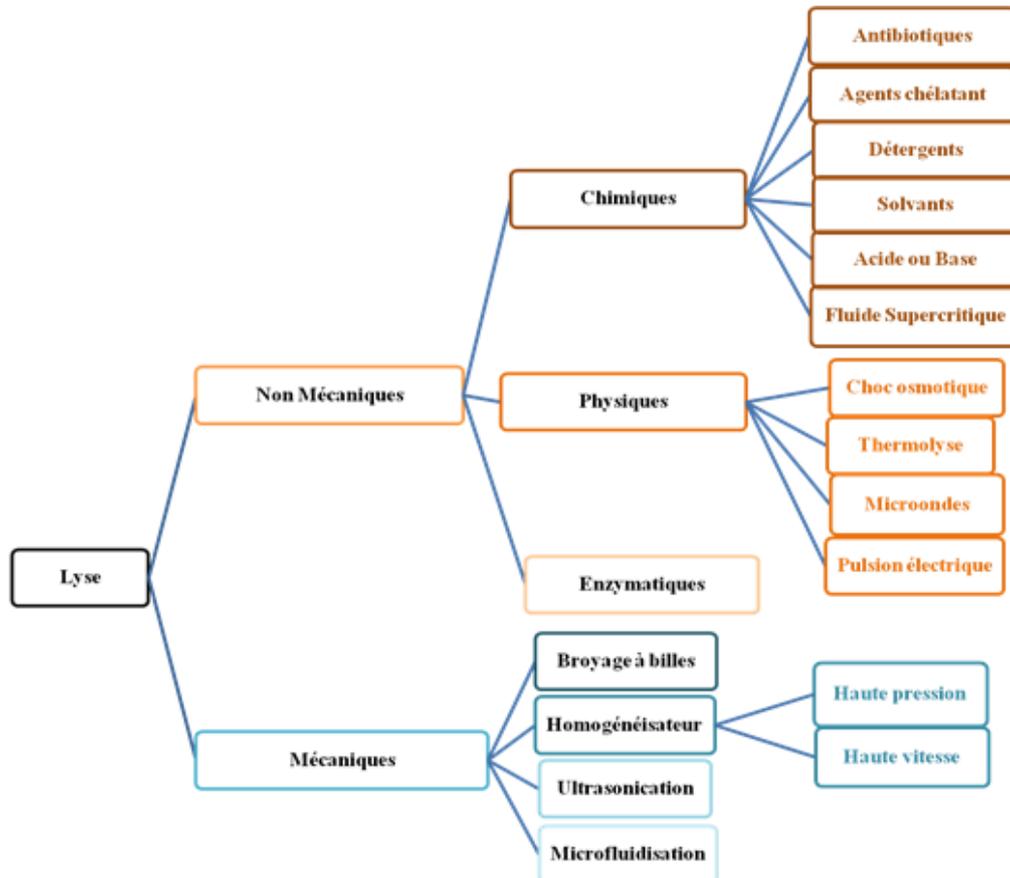


Figure 10 Schéma récapitulatif des principales méthodes de lyse cellulaire adapté de Günerken *et al.*, 2015.

4.1.1. Méthodes de lyse mécaniques

4.1.1.1. Broyage à billes

Cette technique a déjà été utilisée pour lyser des microalgues ayant une paroi cellulaire robuste telles que *Botryococcus*, *Scenedesmus* et *Chlorella* (Lee *et al.*, 2010) . Le rendement de lyse cellulaire peut atteindre 99 %. Le principe de ce broyage est de fragiliser la paroi cellulaire grâce à des contraintes de cisaillement créées par des billes. Ces dernières sont agitées dans un contenant hermétique en présence des cellules à broyer. Les contraintes de cisaillement

occasionnées par les frottements et les mouvements des billes permettent le broyage des cellules. A l'échelle laboratoire, « la chambre d'agitation » est souvent un récipient métallique fixée sur une tige en mouvement et qui permet d'agiter les billes (Doucha et Lívanský, 2008). A l'échelle industrielle le système est plus optimisé, il s'agit d'un rotor sur lequel sont fixées les billes comme le montre la Figure 11. Le broyage s'effectue en continu avec un ajout et un soutirage de l'échantillon automatisés.

Le choix des billes dépend de l'objectif recherché. Augmenter leur diamètre dans la limite de 0,5 mm améliore le rendement de broyage. Des billes de densité importante comme celles au zirconium sont plus adaptées aux produits visqueux. Notons que pour éviter la dégradation des biomolécules, essentiellement les protéines, le nombre de passage dans le broyeur doit rester limité. De plus cette technique est énergivore, notamment pour maintenir constante la température afin de préserver les composés thermosensibles (Günerken *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2012).

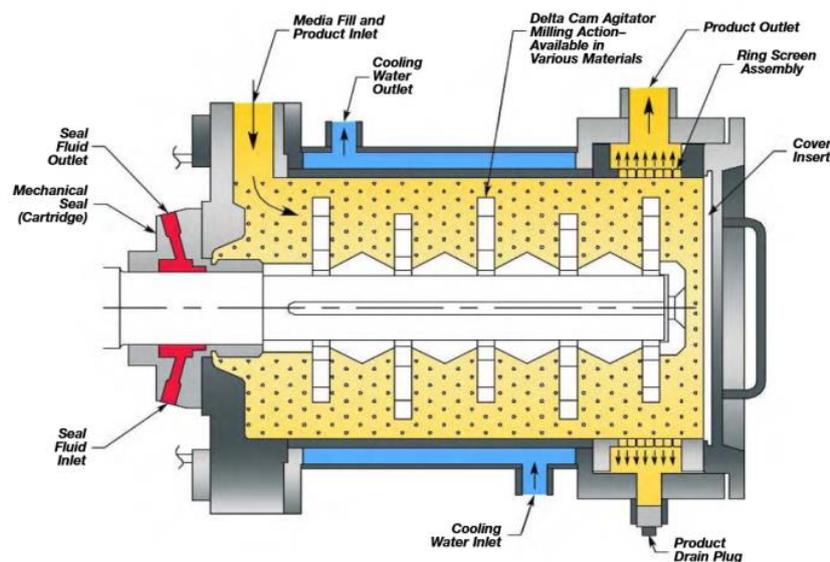


Figure 11 Broyeur à billes industriel, http://www.agt.cl/mining/doc/6_dmq_mill.pdf.

4.1.1.2. Homogénéisation à haute pression (HHP)

Le principe de cette méthode consiste à appliquer une pression élevée sur une suspension de microalgues. L'opération consiste à faire passer l'échantillon à travers une valve de très faible diamètre (quelques micromètres). La différence de pression qui peut atteindre 4 kbar se traduit par une forte contrainte de cisaillement sur les cellules et une forte cavitation à la sortie de valve due à une chute de pression (Figure 12). La combinaison de ces deux phénomènes induit l'éclatement des cellules et libère les contenus intracellulaires. Certains broyeurs haute pression

sont par ailleurs équipés d'une cloche d'impact, contre laquelle la solution est projetée à haute vitesse afin d'augmenter l'efficacité de lyse.

Il s'agit d'un procédé extrapolable à l'échelle industrielle qui est déjà utilisé pour broyer des bactéries (Anand *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2012). C'est une technique particulièrement efficace à l'échelle de laboratoire sur les souches avec une paroi rigide. Il a été reporté comme étant la meilleure méthode de lyse associée à l'extraction aqueuse de protéines chez *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis* et *Nannochloropsis oculata* (Mulchandani *et al.*, 2015; Samarasinghe *et al.*, 2012; Sarada *et al.*, 2006). Sur cette dernière le rendement de désintégration cellulaire avoisine 100 % (Samarasinghe *et al.*, 2012). L'efficacité du broyage peut être améliorée par un nombre de passage plus important dans la chambre de broyage. L'inconvénient majeur de cette technique réside dans l'utilisation des solutions diluées avec des teneurs en matière sèche inférieures à 2 % (Günerken *et al.*, 2015).

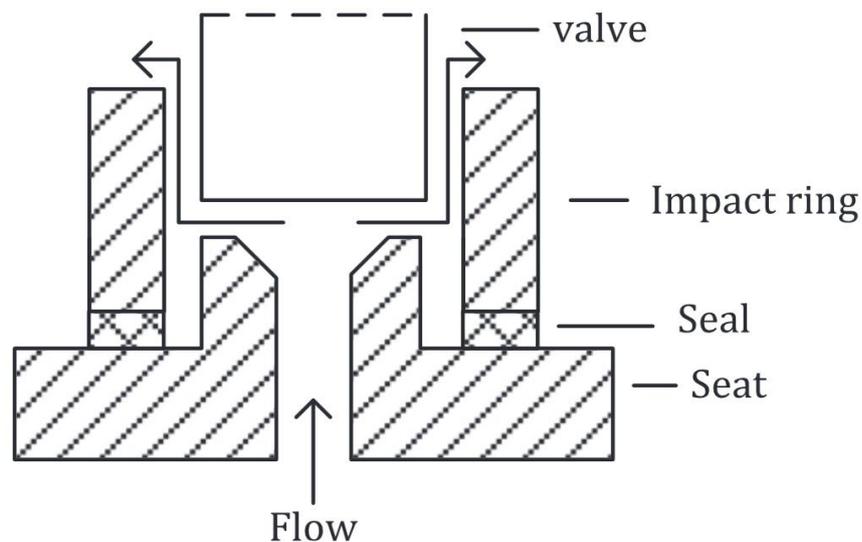


Figure 12 Système de piston typique d'un homogénéisateur à pression (Lee *et al.*, 2012).

4.1.1.3. Homogénéisation par Rotor/Stator

Le principe de fonctionnement d'un homogénéisateur rotor/stator consiste à faire passer les cellules dans l'espace entre les dents du rotor et celles du stator. Lors de ce passage les cellules sont soumises à une contrainte de cisaillement dont l'importance dépendra de l'espace entre les dents du rotor et du stator et de la vitesse d'agitation du rotor. Plus l'entrefer est faible plus la contrainte sera élevée. La lyse cellulaire est donc due à l'effet conjugué de ces deux paramètres. L'hydrodynamique de l'écoulement dans un système rotor/stator reste complexe, l'efficacité de cette technique dépendra du comportement rhéologique du mélange pendant le broyage.

Cette technique a l'avantage d'être utilisable en batch, semi continu et même en continu. Elle permet de travailler avec des temps de contact relativement faibles et avec des suspensions plus concentrées en matière sèche (2-6%). Comme le broyeur à billes, le principal inconvénient de cette méthode réside dans le fait qu'elle soit énergivore. Les cisaillements provoquent une montée en température qu'il faut limiter par un système de refroidissement (Günerken *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2012).

4.1.1.4. Microfluidisation

La microfluidisation est initialement une méthode d'émulsification utilisée en industrie laitière (Ciron *et al.*, 2011). Le principe de fonctionnement est proche de celui de l'homogénéisateur à haute pression. La grande différence est que le microfluidiseur crée une collision hydrodynamique entre 2 jets de fluides, qui remplace l'impact sur la cloche de l'HHP. Les cellules sont fragilisées par le cisaillement et par la décompression explosive du gaz piégé dans l'échantillon liquide. Cette méthode est prometteuse du fait qu'elle est adaptée à des suspensions concentrées en matière sèche. La température est relativement stable et, d'après certains auteurs, elle serait facilement extrapolable à l'échelle industrielle (<http://www.microfluidicscorp.com/applications/cell-disruption/>).

4.1.1.5. Ultrasonication

La sonication consiste à générer des ultrasons (jusqu'à 250 kHz) dans une suspension contenant les cellules à lyser. Des vagues d'ultrasons à haute fréquence génèrent de l'énergie qui provoque une cavitation au sein de la cellule. La formation de radicaux libres associée à la cavitation induit la lyse cellulaire (Günerken *et al.*, 2015).

Pour améliorer l'efficacité de ce procédé de lyse il faut modifier le nombre et la durée des cycles, ainsi que la teneur en matière sèche de l'échantillon à lyser. La fréquence des ultrasons peut aussi contribuer à une optimisation. Toujours dans l'optique d'amélioration de l'efficacité, l'ultrasonication peut être combinée à une méthode de lyse chimique en amont afin de réduire la consommation énergétique et d'améliorer les rendements de lyse (Günerken *et al.*, 2015). L'avantage de cette méthode réside dans sa simplicité de mise en œuvre et sa faible consommation énergétique comparé au broyage à billes par exemple (Boer *et al.*, 2012). Cependant durant le traitement, la température peut augmenter et dénaturer les composés thermosensibles (protéines, pigments) (Borthwick *et al.*, 2005). En outre les radicaux libres, qui permettent de lyser les cellules peuvent causer l'oxydation des molécules d'intérêts. Enfin, la

méthode d'ultrasonication a un rendement de lyse cellulaire souvent inférieur à celle des autres broyages mécaniques tels que le broyage à billes ou l'homogénéisation à haute pression (Halim *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2010). Cela et la montée en température locale lors du procédé de lyse sont ses principaux inconvénients (Günerken *et al.*, 2015).

En conclusion, les méthodes mécaniques sont très souvent utilisées pour lyser les cellules de microalgues car efficaces, même sur des cellules de microalgues possédant des parois cellulaires rigides. Ces méthodes mécaniques ont en commun l'efficacité du broyage, la répétabilité de la lyse cellulaire et surtout la facilité d'une extrapolation de l'échelle de laboratoire à celle industrielle. Cependant ce sont des méthodes de lyse généralement non sélectives et assez énergivores.

4.1.2. Méthodes de lyse physiques

4.1.2.1. Microondes

En présence de molécules diélectriques/polaires, les champs électriques oscillatoires créent des microondes. Ces ondes induisent des mouvements inter- et intramoléculaires qui génèrent des forces de friction et donc de la chaleur qui combinée aux effets d'électroporation ébranle la membrane cellulaire et permet par la même occasion sa lyse.

A l'échelle laboratoire, cette méthode a été mise en œuvre lors de la lyse cellulaire d'espèces telles que *Botryococcus*, *Scenedesmus* et même *Chlorella* (Lee *et al.*, 2010). Le broyage aux microondes est souvent « assisté » d'un solvant afin d'extraire sélectivement un composé d'intérêt, dans ce cas on parle d'extraction assistée aux microondes (EAM). Cette association réduit les étapes en combinant lyse et extraction ce qui permet de minimiser la consommation énergétique. Les paramètres qui ont une incidence sur l'efficacité de la méthode de lyse sont : la fréquence des microondes, la teneur en matière sèche de l'échantillon à traiter ainsi que le type de microalgues. La teneur en matière sèche de l'échantillon est particulièrement importante. Etant donné que les microondes agissent sur les molécules d'eau, il serait probable qu'elles soient plus efficaces sur un échantillon plus dilué (Günerken *et al.*, 2015; Pan *et al.*, 2002; Terigar *et al.*, 2010).

La lyse par les microondes est une technique intéressante mais restreinte aux composés polaires si elle n'est pas assistée d'un solvant. Il est souvent nécessaire de travailler à des températures assez élevées (> 60 °C), qui pourraient dénaturer les composés thermosensibles (Choi *et al.*,

2006). Enfin la formation de radicaux libres lors du traitement peut dénaturer certains composés sensibles.

4.1.2.2. Champs électriques pulsés (CEP)

C'est une technique dans laquelle des champs électriques pulsés de haute intensité sont utilisés pour perforer la paroi ou la membrane cellulaire. Les CEP créent une compression électromécanique liée à une tension électrique qui entraîne une électro-perméabilité de la membrane. Le nombre et la taille des pores ainsi que la réversibilité de l'électro-perméabilité de la membrane dépendent de l'intensité du champ électrique appliqué (Ho et Mittal, 1996; Vanthoor-Koopmans *et al.*, 2013).

La conductivité de l'échantillon, la phase de croissance, le temps de traitement ainsi que la teneur en matière sèche sont tous des facteurs qui influencent l'efficacité de cette méthode de lyse.

Les CEP ont l'avantage d'être facilement extrapolables à l'échelle industrielle. Ils peuvent aussi être associés à d'autres techniques de lyse. Comme pour les microondes, l'ajout de solvants peut permettre de combiner la lyse par CEP et l'extraction des composés. Ainsi ils ont permis d'extraire des lipides et des protéines de microorganismes (Goettel *et al.*, 2013). Cependant l'inconvénient majeur avec cette méthode de lyse est que les échantillons devraient être le moins chargés en ions possibles donc non-conducteurs. Ainsi pour les microalgues marines, une étape de dessalage sera nécessaire en amont de la lyse par CEP (Grimi *et al.*, 2014). De plus la consommation énergétique et l'efficacité de la lyse sont extrêmement échantillons-dépendantes. Il est aussi rapporté dans la littérature que la libération de composés dans le milieu de lyse diminue l'efficacité de la lyse cellulaire des CEP. Toutes ces limites rendent l'utilisation de cette méthode de lyse en bioraffinerie peu intéressante en l'état (Günerken *et al.*, 2015; Parniakov *et al.*, 2015; Vanthoor-Koopmans *et al.*, 2013). Enfin le CEP a un impact négatif sur la digestibilité des protéines de certaines de microalgues telles que *Chlorella* (Janczyk *et al.*, 2005).

D'autres méthodes de lyse physiques existent (Figure 10) dont celles basées sur la température (thermolyse) ou la pression osmotique. Cependant leur efficacité est beaucoup plus faible, en particulier pour les cellules présentant une paroi rigide.

Les microondes et les CEP sont pressentis comme des techniques d'avenir. Elles sont en générale moins énergivores que les méthodes basées sur les contraintes de cisaillement (broyages HP et à billes) (Boer *et al.*, 2012). Cependant leurs contraintes, notamment les conditions opératoires défavorables aux produits thermosensibles (haute température), la limitation de la matière sèche dans l'échantillon à lyser, la formation de produits dénaturants lors de la lyse (radicaux libres) sont autant de freins pour lesquels il sera nécessaire de trouver une alternative.

4.1.3. Méthodes de lyse enzymatiques

La lyse enzymatique repose sur la réaction moléculaire enzyme-substrat durant laquelle le substrat, molécule appartenant à la paroi / membrane cellulaire, est dégradé (Mckenzie et White, 1991). Les lyses enzymatiques sont reconnues comme étant des lyses sélectives, peu dénaturantes par rapport aux autres méthodes et extrapolables à l'échelle industrielle (Zheng *et al.*, 2011). Cependant, elles ne sont efficaces qu'à des concentrations en matières sèches faibles (1%) et le temps de lyse est souvent long (Harun et Danquah, 2011). Par ailleurs, il semble nécessaire d'utiliser un « cocktail » enzymatique afin d'atteindre des rendements de lyse acceptables, ce qui influe nécessairement sur le coût du procédé (Zheng *et al.*, 2011). A ce jour les principales enzymes lytiques utilisés sont les lipases, les peptidases, les glycosidases et les glucanases (Günerken *et al.*, 2015). Par ailleurs, peu d'enzymes actives sur les parois des microalgues sont aujourd'hui décrites. En effet, une souche avec une membrane/paroi cellulaire atypique composée d'une molécule telle que l'algaenane sera d'autant plus difficile à lyser qu'il n'y a pas d'enzyme spécifique à cette molécule. La température, le pH et la concentration en sel sont autant de paramètres qui doivent être contrôlés et optimisés afin d'obtenir une meilleure activité enzymatique (Harun et Danquah, 2011).

Enfin, les enzymes sont des protéines et elles sont considérées comme des contaminants en cas de lyse suivie d'une extraction de protéines. Une alternative serait d'utiliser des enzymes immobilisées afin d'éviter qu'elles n'influencent les résultats. Les enzymes peuvent également induire une dégradation non désirée de certains composants lors de la lyse cellulaire. Ainsi, Mendes-Pinto *et al.* (2001), rapporte l'oxydation de l'astaxanthine après la lyse cellulaire de *H. pluvialis* avec un mélange de protéase et de driselase.

4.1.4. Méthodes de lyse chimiques

Les méthodes de lyse chimique sont souvent laissées pour compte au profit des méthodes mécaniques. Ces méthodes englobent les acides/bases, les détergents, les agents de chélation, les antibiotiques et parfois des solvants.

Les antibiotiques se comportent un peu comme les enzymes en ciblant un composant donné de la paroi cellulaire et en inhibant sa synthèse. Les agents de chélation interfèrent dans les liaisons cationiques de l'enveloppe cellulaire tandis que les détergents tels que l'EDTA forment des micelles avec la membrane. Les bases saponifient les lipides membranaires et perméabilisent par la même occasion la cellule. Néanmoins cette méthode de lyse s'accompagne d'une température de travail assez élevée (environ 120 °C) (Günerken *et al.*, 2015). L'effet conjugué de la haute température et du pH peut provoquer la dénaturation de composés tels que les protéines ou l'astaxanthine (Jiang *et al.*, 2009a; Mendes-Pinto *et al.*, 2001). Les acides sont plutôt des perforateurs de la membrane/paroi cellulaire. Leur efficacité est accentuée à haute température (160°C). A l'instar des bases, une lyse acide à haute température dénature les composés thermosensibles. Il existe d'autres méthodes de lyses chimiques un peu plus exotiques telles que les surfactants et les agents oxydants. Ils sont utilisés pour perforer des microalgues mais le rendement de lyse est très souches-dépendant. Le principal inconvénient des lyses chimiques réside dans la contamination des composés d'intérêts. En effet la présence de détergent ou d'agent de chélation dans le milieu lors de la phase d'extraction pourrait entraîner une réaction indésirable (Günerken *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2010).

4.1.5. Comparaison des méthodes de lyse

Les méthodes de lyse cellulaire mécaniques ou physiques semblent donc à privilégier. D'une part, elles sont toutes à un niveau de développement industriel. Par ailleurs, elles évitent l'introduction de « contaminants » comme dans le cas des méthodes chimiques et enzymatiques et sont plus facilement extrapolables à grande échelle. Néanmoins, ce sont des méthodes très consommatrices en énergie (Tableau 4).

La méthode la moins consommatrice en énergie tout en ayant une efficacité élevée semble donc être l'utilisation de microondes, à condition que les microondes soient assistés d'un solvant d'extraction. En deuxième position se trouve le broyeur à billes, suivi de l'homogénéisateur haute pression.

Tableau 4 Comparaison de l'efficacité et de la consommation énergétique des méthodes de lyse mécaniques et physiques d'après Lee *et al.*, 2012.

Méthodes	Conditions expérimentales (souche, volume, concentration, puissance consommée, durée de lyse)	Efficacité de lyse	Consommation énergétique (MJ/kg biomasse sèche)
Ultrasons	<i>Chlorococcum sp.</i> 20 mL, 8,5 kg/m ³ , 750 W, 5 min	Faible	132
HHP	<i>Chlorococcum sp.</i> 200 mL, 8,5 kg/m ³ , 2.5 kW, 6 min	Elevée	129
Broyage à billes	<i>Botryococcus, Chlorella, Scenedesmus</i> 100 mL, 5 kg/m ³ , 840 W, 5 min	Elevée	67,5
Microondes	<i>Botryococcus, Chlorella, Scenedesmus</i> 100 mL, 5 kg/m ³ , 700 W, 5 min	Elevée	420
Microondes + solvant	<i>Scenedesmus</i> 100 mL, 75 kg/m ³ , 1,2 kW, 1 min	Elevée	9,6
Microfluidisation	<i>S. cerevisiae</i> 50 L, 10 kg/m ³ , 5,5 kW, 50 min	Moyenne	33

Une fois la lyse cellulaire effectuée, les composants de la cellule doivent pouvoir être extraits. Différentes méthodes d'extraction peuvent être mises en œuvre en fonction de la nature du composé à extraire.

4.2. Méthodes d'extraction

Le choix de la méthode d'extraction est soumis en premier lieu aux caractéristiques biochimiques du produit à extraire. Dans l'idéal, la méthode devra être rapide, reproductible, la moins consommatrice en solvant et en énergie, sélective du produit d'intérêt et respectueuse des fractions extraites. La méthode d'extraction est généralement associée à un solvant qui a le plus d'affinité avec le composé cible afin d'optimiser son extraction. Un certain nombre d'entre eux seront donc présentés.

4.2.1. Solvants

La présence de solvants est souvent reportée lors des lyses mécaniques ou chimiques (Marcati *et al.*, 2014 ; Patel *et al.*, 2005 ; Safi *et al.*, 2014b). Dans ces cas on parle d'extraction assistée par une méthode de lyse. Les extractions assistées sont le plus souvent appliquées avec des

techniques de lyse tels que les microondes, la sonication, le broyage mécanique de même que les champs électriques pulsés (Parniakov *et al.*, 2015).

Les solvants usuels sont des solvants organiques polaires ou apolaires qui servent à l'extraction des composés liposolubles et hydrosolubles. L'hexane, le chloroforme, l'éthanol, ainsi que le diéthyl-éther permettront par exemple d'extraire les composés liposolubles (lipides et la plupart des pigments). L'eau ou les solvants aqueux permettent de récupérer des composés tels que les protéines, les polysaccharides et les phycobiliprotéines. L'extraction par un mélange de solvants est aussi possible, qu'ils soient organiques/inorganiques ou organique/eau, ces mélanges permettent d'améliorer les rendements d'extraction et la récupération simultanée de composés de natures biochimiques différentes. L'un des mélanges les plus utilisés pour l'extraction des lipides est constitué de méthanol : chloroforme : eau, avec différents ratios selon les méthodes. Ce mélange permet de récupérer les lipides à la fois polaires et apolaires. Le Tableau 5 présente quelques solvants et les rendements d'extraction de différents composés d'intérêts. Les différentes souches de microalgues ainsi que les méthodes de lyse seront précisées afin de donner un aperçu de l'importance de ces deux paramètres dans l'efficacité de l'extraction, cette dernière étant très variable selon la méthode de lyse mais aussi et surtout selon la souche de microalgues.

Les solvants ont l'avantage de présenter des rendements d'extraction importants. Cependant leurs propriétés biochimiques les rendent de moins en moins attractifs. En effet ils sont parfois inflammables, tels que les alcools, d'autres sont halogénés donc nocifs pour l'Homme comme le chloroforme ou le phénol. Ils ne sont pas toujours recyclables et ils posent le problème du traitement des déchets organiques en aval de l'extraction. En réponse à tous ces problèmes, les recherches les plus récentes s'orientent vers des solvants d'extraction avec moins d'impacts négatifs. Certains chercheurs testent et utilisent des alternatives tels que des composés supercritiques : l'azote ou le gaz carbonique (CO₂SC) et parfois même de l'eau sous critique. Les liquides ioniques constituent aussi une option de plus en plus étudiée. Ils apportent une réponse à la majorité des inconvénients cités ci-dessus, excepté celui de l'aspect économique et écologiques de ces procédés. Ces considérations expliquent leur utilisation modérée à grande échelle pour l'extraction des composés de microalgues.

Tableau 5 Exemples de solvants d'extraction de différents composés d'intérêts utilisés sur différentes souches de microalgues ainsi que les méthodes de lyse associées

Solvants	Composés	Souches	Méthodes de lyse	Rendement	Références
Eau	Protéines	<i>H. pluvialis</i> <i>N. oculata</i> <i>C. vulgaris</i> <i>A. platensis</i> <i>P. cruentum</i>	Broyage manuel	7-50%	(*Safi <i>et al.</i> , 2014)
			HHP	41-90%	
			Ultrasons	9-67%	
			Base (pH12)	16-74%	
		<i>T. suecica</i>	Broyage à billes	58%	(Schwenzfeier <i>et al.</i> , 2011)
		<i>Nannochloropsis</i> Spp.	CEP+Base (pH 8,5-pH 11)	1 à 2%	(Parniakov <i>et al.</i> , 2015)
	Ultrasons+Base (pH 8,5-pH 11)		2,5 à 3,5		
	Sucres	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Broyage à billes	< 3%	(Ansari <i>et al.</i> , 2015; Miranda <i>et al.</i> , 2012)
			HHP		
			Ultrasons		
Autoclavage			5%		
Acide+ Autoclavage			12-13%		
Base + Autoclavage			<3%		
Chloroforme : Méthanol (1 : 1)	Lipides	<i>Scenedesmus</i> sp <i>C. vulgaris</i> <i>B. braunii</i>	Broyage à billes	10%-28%	(*Lee <i>et al.</i> , 2010)
			Microondes	10-29%	
			Ultrasons	<15%	
			Autoclavage		
			Choc osmotique		
Chloroforme : méthanol : Eau	Lipides Acide Linoléique	<i>C. vulgaris</i>	Broyage manuel	52,5%	(Widjaja <i>et al.</i> , 2009)
				100%	(Mendes <i>et al.</i> , 2003)
		<i>A. maxima</i>	/	33%	
			/	73%	
			/	60%	

*Ces auteurs reportent une progression croissante du rendement d'extraction de la première à la dernière microalgue citée, peu importe la méthode de lyse mise en œuvre.

4.2.2. Fluides supercritiques (FSC)

Lorsqu'un fluide est amené à une pression et une température supérieures à son point critique, il devient supercritique (Figure 13). A ce stade, le fluide a un comportement intermédiaire entre le liquide et le gaz. Ainsi il possède une densité similaire à celle des liquides et une viscosité

proche de celle des gaz. Le fluide est compressible tout en ayant une diffusivité proche des deux états (liquides et gaz).

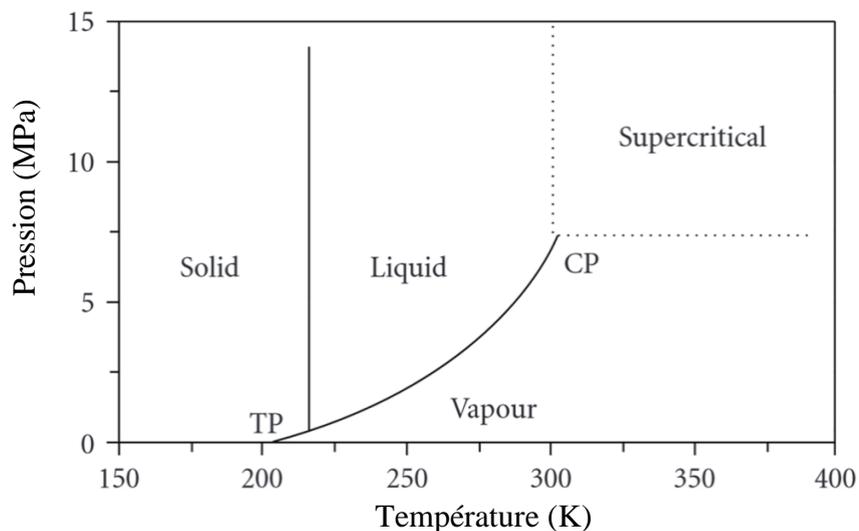


Figure 13 Diagramme de différentes phases du dioxyde de carbone en fonction de la pression (MPa) et de la température (K).

Ces propriétés physicochimiques sont ses atouts majeurs comparés aux autres solvants utilisés lors de l'extraction des composés. Ils sont ainsi plus facilement transportables, ils diffusent mieux à travers les matériaux solides et donne des rendements d'extraction très intéressantes. Ce sont des substances assez malléables, leur densité peut être modifiée grâce à une variation de température ou de pression. La densité étant corrélée à la solubilité, une variation de pression lors de l'extraction permettrait d'améliorer le rendement d'extraction du fluide supercritique. Enfin ce sont des fluides qui sont obtenus à partir de solvants « généralement reconnus comme inoffensifs » (GRAS).

Il existe plusieurs types de solvants supercritiques : l'éthène, l'eau, le méthanol, l'éthane, etc. Le plus utilisé reste le dioxyde de carbone (CO_2) parce qu'il a un point critique à une température et une pression relativement basses : température $31,3^\circ\text{C}$ et pression 73,8 bar (Figure 13). Il permet ainsi de mettre en œuvre des conditions d'extraction respectant les produits thermosensibles. Etant donné qu'il est sous forme gazeux à température et pression normales, son élimination post-extraction est plus aisée et l'extrait obtenu est dépourvu de contaminant. Le second solvant le plus utilisé en supercritique est l'eau. Elle possède certes un point critique à une pression et une température plus élevées (101°C ; 221 bar) mais a l'avantage de ne pas être toxique. Elle est utilisée pour extraire des composés à la fois polaires et apolaires.

Comparé à l'eau, le CO₂ est moins efficace dans l'extraction des composés polaires. Pour palier à cette limite, il existe des extractions aux FSC assistées par des co-solvants tels que l'eau, le méthanol et même l'éthanol. L'addition de l'éthanol lors de l'extraction de lipides chez *Spiruline* a permis d'améliorer le rendement d'extraction de + 8% (Mendes *et al.*, 2003).

Le principal inconvénient de ce procédé d'extraction est le coût élevé des installations. Cette méthode est donc principalement mise en œuvre pour l'extraction de composés à haute valeur ajoutée. Par ailleurs, atteindre les conditions supercritiques nécessite des installations qui sont à la fois sensibles et énergivores. En outre, dans le cas de l'eau supercritique, la température (> 100 °C) sera dénaturante pour les composés thermosensibles. (Herrero *et al.*, 2006; Hosikian *et al.*, 2010; Mendes *et al.*, 2003). En revanche, l'utilisation de fluide supercritique peut permettre de s'affranchir de l'étape de lyse cellulaire. En effet, le fluide supercritique est capable de diffuser dans des cellules entières, l'expansion du gaz dans la cellule entraîne une fragilisation de la membrane. Le rendement de lyse peut atteindre 80%, par contre cette valeur est très largement souche-dépendante et moins importante lorsque la paroi cellulaire est robuste (Lin *et al.*, 1992).

4.2.3. Liquides ioniques (LI)

Ce sont des liquides composés d'un mélange d'anions et de cations qui restent liquides à des températures comprises entre 0 et 140°C. Ce mélange de sels, des cations organiques liés à des anions organiques ou inorganiques, est thermostable et non volatile. Il est possible de les sélectionner de telles sortes qu'ils aient une solubilité, une polarité, une conductivité et même une hydrophobicité adaptée aux besoins de l'extraction. Cette malléabilité offre une large possibilité d'extraction de composés.

A ce jour, ils ont déjà été utilisés pour l'extraction en phase liquide chez *Chlorella* et *Dunaliella*. Ils sont parfois associés à d'autres solvants (par exemple le méthanol). Le co-solvant est supposé agir comme un solvant de lyse, tandis que le liquide ionique extrait les lipides. Cette association améliore le rendement d'extraction au minimum de 15 % selon Young *et al.*, (2010) ou de 10 % environ selon Kim *et al.*, (2012). L'autre avantage du co-solvant est qu'il permet de pré-purifier, les composés extraits en fonction de leur affinité envers le co-solvant ou le liquide ionique.

Cependant il est parfois nécessaire de purifier les liquides ioniques avant leur utilisation en tant que solvant d'extraction. Certains paramètres tels que la teneur en eau et le pH influencent grandement l'efficacité d'extraction des liquides ioniques. En outre, leur viscosité élevée peut

être un frein à la dissolution des solutés. Enfin, selon Park et Kazlauskas, (2003) les liquides ioniques sont environ 800 fois plus coûteux que les solvants usuels.

La solubilité des liquides ioniques dans l'eau et leur toxicité aux organismes aquatiques posent le problème sur l'aspect vert de ces solvants. Ainsi pour qu'ils soient considérés comme « verts », il faudrait dans un premier temps pouvoir les recycler afin d'éviter qu'ils ne contaminent sol et eau, en outre leur synthèse, utilisation, application, récupération doit s'intégrer dans un procédé plus écologique et plus sûr (Louaisil *et al.*, 2011). Suite à la lyse cellulaire et à l'extraction des composés, il est souvent nécessaire de les séparer/purifier du solvant.

Enfin pour beaucoup, il n'existe pas de solvants verts, le meilleur solvant est celui qui contribue à rendre un procédé vert. Ce produit idéal doit répondre à plusieurs critères : avoir une origine renouvelable (non alimentaire) ou recyclé, être non toxique, être produit par un procédé respectueux de l'environnement, faire progresser l'application par son utilisation, être accepté par le consommateur, être économiquement compétitifs (F. Jerome, 2017).

5. Séparation / purification des composés

Les extraits bruts des matrices contiennent souvent plusieurs métabolites, ce qui nécessite une étape de séparation et de purification. Les méthodes de purification sont généralement chromatographiques. Par exemple les acides gras peuvent être purifiés par chromatographie en phase inverse ou d'absorption, tandis que les protéines et les sucres seront purifiées par chromatographie échangeuse d'ions ou d'exclusion stérique (Molina Grima *et al.*, 2003). Il existe cependant d'autres méthodes, moins conventionnelles, pour purifier les métabolites d'intérêts issus des microalgues.

5.1. Chromatographie de partage centrifuge (CPC)

La chromatographie de partage centrifuge est une chromatographie liquide-liquide sans support solide pour maintenir la phase stationnaire. Une colonne de CPC est constituée d'un empilement de disques dans lesquels sont gravés des canaux (également appelés cellules) reliés par des conduits. Cet empilement de disque tourne autour d'un axe à une vitesse de rotation choisie. La phase stationnaire est alors retenue dans les cellules et la phase mobile traverse la phase stationnaire sous l'effet de la force centrifuge (Marchal *et al.*, 2013) (Figure 14). Différents paramètres sont donc à définir afin d'obtenir une séparation efficace des composés : le système de solvants utilisé, le débit et la vitesse de rotation, le mode d'élution utilisé.

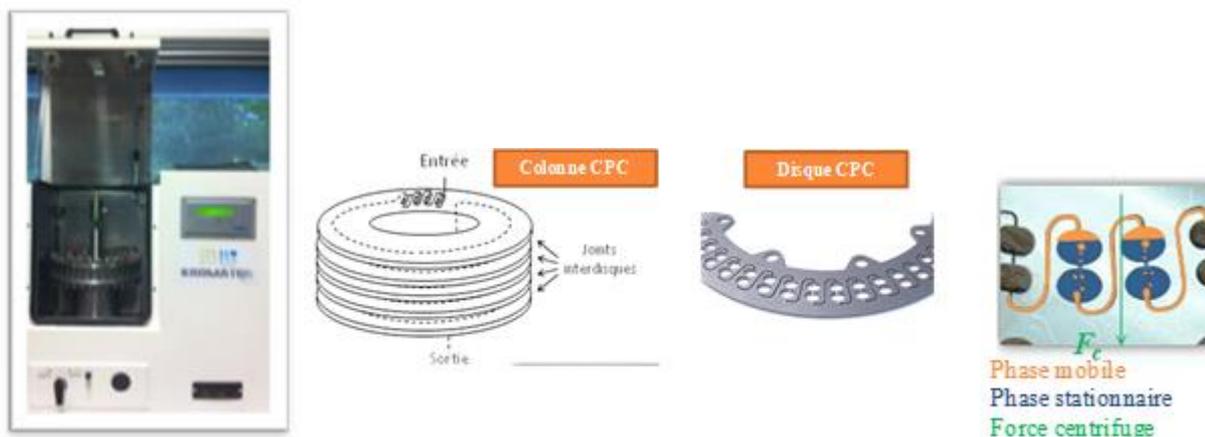


Figure 14 Image d'un appareil de chromatographie de partage centrifuge (Fast CPC (FCPC); Kromaton) et Principe de circulation des phases (mobile et stationnaire) et différentes composantes d'un chromatographe de partage centrifuge <http://www.kromaton.com/fr/la-cpc/technologies>.

5.1.1. Le système de solvants

Le fractionnement en CPC est basé sur la différence de partage des solutés entre 2 phases liquides non miscibles. Ce système bi-phasique est préparé en mélangeant deux ou plusieurs solvants non miscibles. L'un des deux constituera la phase stationnaire, l'autre la phase mobile. Les solutés seront séparés en fonction de leur affinité pour les solvants. Ils seront entraînés avec la phase mobile ou ils resteront piégés dans la phase stationnaire. Cette répartition moléculaire permet la séparation/purification des métabolites. Le coefficient de partage appelée aussi coefficient de distribution (K_D), est le ratio de la concentration d'un soluté dans la phase 1 et la phase 2 d'un système biphasique à l'équilibre (Berthod et Armstrong, 1988). Le système de solvant choisi pour un soluté donné devrait permettre d'avoir un coefficient de partage K_D compris dans l'intervalle 0,5 et 1 d'après Ito (2005). Selon cet auteur, une valeur de coefficient inférieur à 0,2 provoquerait l'élution du soluté avec le front d'élution avec une faible résolution. Tandis qu'avec un K_D trop élevé, la résolution est certes améliorée, mais l'élution du soluté est « étalée » ce qui rallonge le temps d'élution.

Lors du processus chromatographique, les différents solutés émergent de l'appareil CPC suivant un ordre défini, après un volume de rétention V_r calculé selon l'Équation 1 :

$$V_r = V_m + K.V_s$$

Équation 1 Volume de rétention d'un soluté dans une colonne de CPC

avec :

V_r : volume de rétention,

V_m : volume de phase mobile dans l'appareil

V_s : est le volume de phase stationnaire liquide retenue par l'appareil

K : le coefficient de partage liquide-liquide du soluté considéré.

Les volumes de phase stationnaire et mobile ont donc leur importance. Par ailleurs, le taux de rétention de phase stationnaire au sein de la colonne influe sur l'efficacité de séparation des solutés en CPC. En effet, lors de la mise en œuvre d'une opération de CPC, la colonne est tout d'abord remplie de phase stationnaire et mise en rotation à la vitesse choisie. La phase mobile est ensuite pompée selon le débit et le mode d'élution choisis. La phase mobile introduite déplace alors un certain volume de phase stationnaire dépendant des conditions opératoires, jusqu'à atteindre un état d'équilibre stable. Il est alors important de déterminer le pourcentage volumique de phase stationnaire présente dans la colonne selon l'Équation 2.

$$Sf (\%) = (V_{stat} / V_{col}) \times 100$$

Équation 2 Calcul du pourcentage volumique de phase stationnaire présente dans la colonne

avec :

$Sf \%$: pourcentage volumique de phase stationnaire présente dans la colonne

V_{col} : volume total de colonne

V_{stat} : volume de la phase stationnaire

De façon pratique, le pourcentage de rétention de phase stationnaire $Sf (\%)$ peut être obtenu indirectement par la mesure du volume de phase stationnaire V_m chassée de la colonne à la suite de la mise en équilibre. Il est alors calculé selon l'Équation 3.

$$Sf (\%) = ((V_{col} - V_m) / V_{col}) \times 100$$

Équation 3 Calcul du pourcentage volumique de phase stationnaire présente dans la colonne par mesure indirecte

avec :

$Sf \%$: pourcentage volumique de phase stationnaire présente dans la colonne

V_{col} : volume total de colonne

V_m : volume de phase stationnaire chassée de la colonne lors de la mise en équilibre

5.1.2. Le mode d'élution

Le mode d'élution des phases du système bi-phasique revêt aussi de l'importance. Ainsi une vanne de commutation permet de définir le sens de circulation de la phase mobile lors d'une CPC. Il existe deux modes de circulation (Figure 15) :

- le mode ascendant durant lequel la phase mobile est pompée en contresens du champ de force centrifuge,
- le mode descendant durant lequel la phase mobile est percolé à travers la phase stationnaire dans le sens de la force centrifuge.

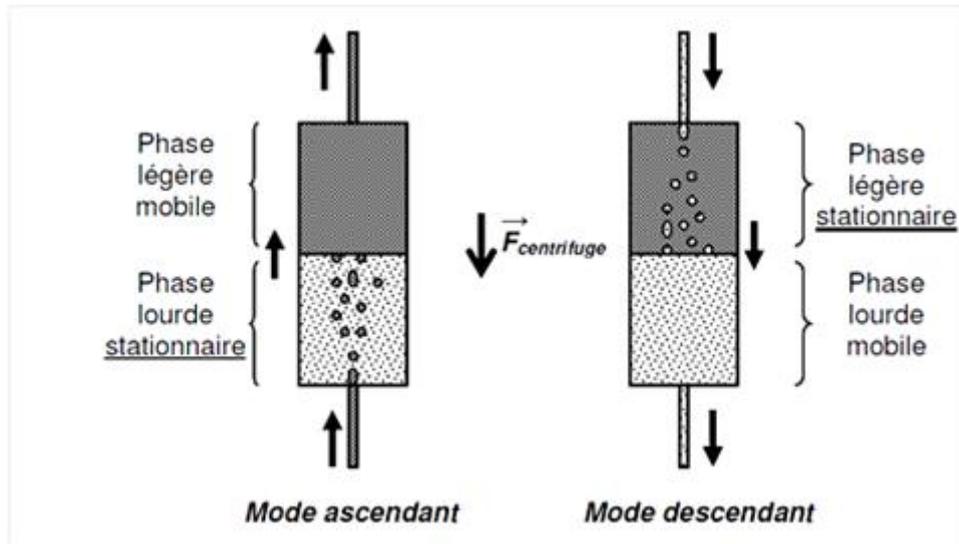


Figure 15 Illustration des modes ascendant et descendant d'élution de la phase mobile en CPC (Toribio, 2007).

Dans certains cas, il reste encore des solutés piégés dans la phase stationnaire à la fin de l'élution de la phase mobile. Afin de récupérer l'intégralité de ces solutés, la phase stationnaire est éluee à son tour. Cette technique d'élution des solvants permet de récupérer l'intégralité des solutés injectés dans le système, on parle d'extrusion. Une autre mode d'élution est utilisée en CPC : le « Dual Mode ». Lorsque les solutés à purifier ont des polarités différentes, l'élution isocratique n'est plus d'une grande utilité. Dans ce cas pour séparer les composés, il est possible d'inverser le rôle et la polarité des phases. A la permutation de vanne de commutation, la phase mobile devient la phase stationnaire. Si la phase mobile est plus polaire, elle emportera lors de l'élution les composés polaires tandis que la phase apolaire stationnaire deviendra la phase mobile et il devrait entraîner les composés de polarité similaire avec elle. Il existe des travaux qui traitent de multiple-Dual Mode (MDM), toujours dans l'optique d'affiner la purification des solutés (Delannay *et al.*, 2006).

5.1.3. Le débit et la vitesse de rotation

Enfin, les vitesses de rotation et le débit de pompage de l'échantillon sont importants dans la mise en œuvre de la CPC. En effet l'efficacité de séparation en CPC dépend entre autre du type d'écoulement de la phase mobile. Comme le montre la Figure 16, l'efficacité de la CPC est

optimale lorsque l'écoulement de la phase mobile est sous forme de jets atomisés (Marchal *et al.*, 2000).

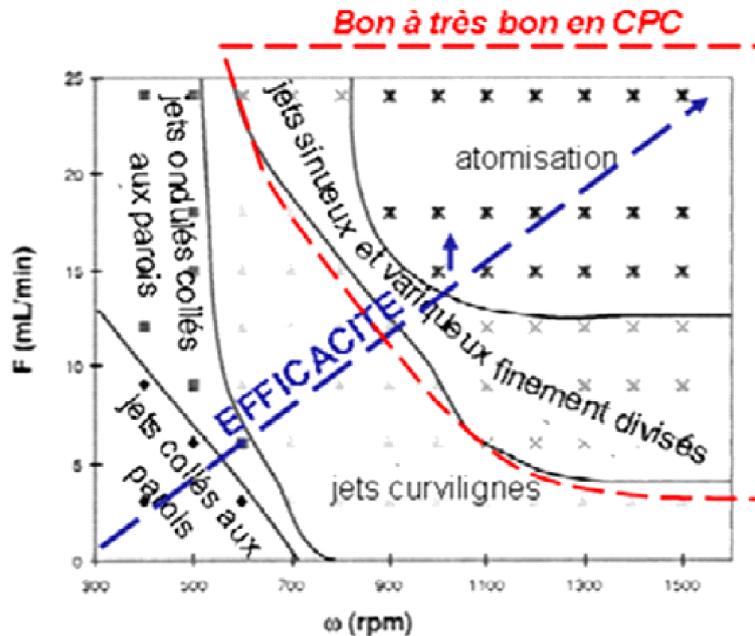


Figure 16 Evolution de l'efficacité de la colonne en fonction du type d'écoulement dans une cellule de partage en CPC, du débit de pompage en mode descendant et de la vitesse de rotation pour le système bi-phasique heptane : méthanol (1 : 1; v / v) d'après Marchal *et al.*, (2000).

5.1.4. Applications de la CPC

Une séparation efficace par CPC passe donc par le choix d'un système bi-phasique adapté. Il s'agit d'une des étapes cruciales de la CPC. Il existe plusieurs systèmes de solvants, dont des binaires et des ternaires adaptés à la nature des solutés cibles (Ito, 2005 ; Renault *et al.*, 1995).

Pour la purification de la fucoxanthine, un caroténoïde issu d'algues brunes, un mélange de n-hexane : éthyl acetate : éthanol : eau avec un ratio volumique de 5 : 5 : 7 : 3 a été testé avec succès (Kim *et al.*, 2011). Pour la purification d'oligomères de xylose ainsi que pour la séparation de différentes classes de lipides, c'est le système diméthylsulfoxyde (DMSO) : tétrahydrofurane (THF) : Eau (1 : 6 : 3, v/v/v) et n-hexane : méthanol : eau (1 : 0,9 : 0,1, v/v/v) qui ont été utilisés respectivement (Alvarez *et al.*, 1990; Lau *et al.*, 2010). La CPC a par ailleurs été testée comme méthode d'extraction en continu de beta-carotène par Marchal *et al.*, (2013).

La CPC est donc une méthode décrite comme étant plus économique que la chromatographie liquide haute performance (CLHP) car elle ne nécessite pas l'utilisation d'une colonne à lit fixe et parce que la consommation en solvant est moins importante. Les pertes en échantillons et la

dénaturation limitées sont aussi des atouts non négligeables favorisant son utilisation. La CPC a aussi l'avantage d'être plus performante que la CLHP car elle atteint des taux de purification proche de 100% tout en étant préparative. Le temps de procédé de purification est assez court et elle est polyvalente. Il est possible de purifier un large panel de métabolites en utilisant le bon couple de solvants. L'inconvénient majeur avec la phase stationnaire liquide est que ses propriétés physiques peuvent être altérées par l'échantillon injecté, par exemple si ce dernier contient un surfactant (Sutherland, 2007). Les autres inconvénients sont plutôt inhérents aux solvants, notamment la difficulté de leur mise en œuvre (toxicité, inflammabilité) et les possibilités limitées de recyclage. Enfin un post-traitement est souvent nécessaire afin d'éliminer les solvants considérés comme des contaminants (<http://www.kromaton.com/fr>; Marchal *et al.*, 2003).

5.2. Méthodes membranaires

Les méthodes de séparation membranaires sont des procédés de filtration à travers des membranes de seuil de coupure et de composition chimiques variable. Le fractionnement ou la concentration se fait sous l'effet d'un gradient de pression. Le choix de la méthode de filtration dépend de la taille des molécules à séparer. Ainsi la microfiltration permet de retenir les molécules ou particules ayant une taille supérieure à 0,1-1 μm . L'ultrafiltration retient celles dont la taille est supérieure à 0,01-0,1 μm et en dessous de 0,1 μm les molécules sont retenues par de la nanofiltration.

Pour les microalgues, l'ultrafiltration est le procédé membranaire le plus utilisé. Sa première application a été en tant que méthode de récolte de la biomasse microalgale (Li *et al.*, 2011). Dernièrement, elle a servi à la purification de composés d'intérêts extraits de microalgues. Des polysaccharides issus de *Spirulina platensis*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Chaetoceros muelleri*, *Haematococcus pluvialis* (Li *et al.*, 2011) ainsi que de *Porphyridium cruentum* (Patel *et al.*, 2013) ont été purifiées par ultrafiltration. Marcati *et al.* (2014) ont proposé une double ultrafiltration (à 300 kDa puis à 10 kDa), permettant le traitement d'un surnageant de broyage de *Porphyridium cruentum* et la séparation des polysaccharides, des protéines et de la phycoérythrine (pigment rouge). De la même façon, Safi *et al.*, (2014a) ont reporté la mise en œuvre d'une ultrafiltration en cascade sur un extrait de *Tetraselmis suecica*. Dans un premier temps, les protéines sont séparées de l'amidon, puis dans un second temps les sucres des protéines. Les méthodes membranaires ont l'avantage d'être extrapolable à l'échelle industrielle. Elles sont facilement automatisables et peuvent traiter de grands volumes.

Néanmoins, elles sont généralement limitées au fractionnement de molécules hydrosolubles. En effet, même s'il existe différents types de membranes, les plus couramment utilisées sont en cellulose ou en polyethersulfone, ce qui limite les solvants compatibles.

5.3. Purification chimique

Les méthodes de purification chimiques passent le plus souvent par une précipitation du composé d'intérêt cible. Elles s'appuient sur des paramètres tels que le pH ou des solvants / molécules qui ont une affinité assez élevée avec la molécule cible à purifier.

5.3.1. Méthodes usuelles

Ces méthodes classiques de précipitation peuvent être utilisées pour la purification des protéines ou des polysaccharides.

La précipitation acide, simple à mettre en œuvre, est la principale méthode de purification protéique. Elle est basée sur la recherche du point isoélectrique (*pI*) de la majorité des protéines d'un extrait. A ce point de pH, les protéines ne sont pas chargées (charge nette nulle) et leurs forces de répulsion sont annulées, ce qui facilite leur précipitation. Par une baisse progressive du pH, il est ainsi possible de fractionner les protéines en fonction de leurs *pI* respectifs (Cavonius *et al.*, 2015; Ursu *et al.*, 2014).

Le sulfate d'ammonium ((NH₄)₂SO₄) est l'une des molécules usuelles permettant la purification des protéines en les faisant précipiter. Le principe de la précipitation par le sulfate d'ammonium s'appuie sur le « salting out ». En effet les liaisons entre les molécules d'eau et les protéines en solution sont détournées par les ions sulfates. A une concentration critique de sulfate d'ammonium, les protéines précipitent. Ce composé est souvent utilisé dans les premières étapes de d'une purification protéique. Il a aussi un rôle stabilisant chez certaines protéines (Reis *et al.*, 1998; Rosenberg, 2013).

Les polysaccharides peuvent être sélectivement précipités en présence d'alcools (généralement 3 volumes d'alcool par volume de solution de polysaccharide). En fonction du polysaccharide à purifier, un alcool plus ou moins polaire sera préféré. Les plus utilisés restent l'éthanol ou l'isopropanol. L'utilisation d'alcool glacé, ou le stockage du mélange à -20°C pendant quelques heures accentuent encore la précipitation. Néanmoins, la présence de sels dans la solution (co-précipités avec le polysaccharide) conduira à des taux de pureté faibles et des difficultés de remise en solution des polymères (Patel *et al.*, 2013).

Enfin, les polymères polyanioniques tels que certains polysaccharides peuvent être sélectivement précipités par un surfactant cationique, l'hexadécyltriméthylammonium bromide (CTAB). Il permet également de purifier des lipopolysaccharides bactériens (Karamanos *et al.*, 1992)

5.3.2. Polyéthylèneimine (PEI)

Parmi les composés chimiques qui permettent la purification de métabolites on peut également citer le polyéthylèneimine (PEI). Il s'agit d'un polymère d'éthylèneimine qui peut être sous forme linéaire ou branché, avec un degré de polymérisation (n) élevé allant de 700 à 2000 (Figure 17). Cette molécule organique est riche en groupement amine et ses groupes imino ont un pKa compris entre 10 et 11, ce qui lui confère une charge positive (cationique) à pH neutre (Burgess, 1991).

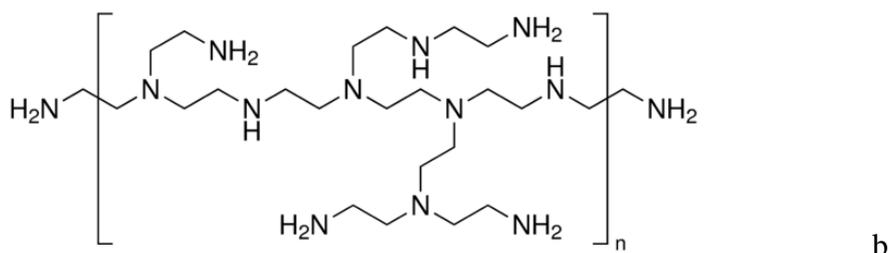


Figure 17 Polymère de l'éthylèneimine linéaire (a, Burgess, 1991) et branché (b, <http://sigmaaldrich.com>).

Le principe de purification du PEI s'appuierait sur une différence de charge entre le polymère et sa molécule cible. En effet, les charges positives du PEI se lient aux macromolécules chargées négativement tels que des acides nucléiques ou d'autres molécules anioniques. Un réseau moléculaire se forme à partir de ces liaisons avec des composés acides, il finit par devenir un précipité récupérable par centrifugation (Burgess, 1991).

Plusieurs paramètres influencent l'efficacité de fractionnement du PEI. Les paramètres qui influencent la formation de ce réseau anion-cation sont la force ionique, le pH de floculation ainsi que la concentration en PEI et la pré-clarification éventuelle de l'échantillon par du tétraborate de sodium (borax, Milburn *et al.*, 1990; Salt *et al.*, 1995; Salt *et al.*, 1996). En effet l'ajout de NaCl ralentit les particules et permet la floculation avec de faibles concentrations en

PEI (Salt *et al.*, 1996). Dans le cas d'une pré-clarification avec du borax, Salt *et al.*, (1995) ont démontré que l'ajout de NaCl permet de diminuer de 40 à 14% le pourcentage de protéines floculées avec les contaminants d'un extrait de levures (*S. cerevisiae*). Cependant un excès de NaCl ou de PEI entraîne l'effet inverse avec une resolubilisation des composés floculés.

Selon le poids moléculaire du polymère, on peut avoir des applications différentes. Ainsi avec un poids moléculaire relativement faible (2 kDa), le PEI a la propriété d'un stabilisateur de molécules protéiques en solution (Mazzaferro *et al.*, 2010; Andersson *et al.*, 2000). Tandis que les PEI de haut poids moléculaire sont responsables de la floculation des bactéries d'après Treweek et Morgan, (1977). Néanmoins, Salt *et al.*, 1995 ne trouvent pas de relation directe entre le poids moléculaire du PEI et son efficacité à floculer. Ils ont d'ailleurs observé une tendance à la resolubilisation des contaminants lorsque le poids moléculaire est trop élevé. Dans les travaux qui sont présentés, la majorité travaille dans des conditions de pH neutre (Milburn *et al.*, 1990; Salt *et al.*, 1995 Mazzaferro *et al.*, 2010). Les travaux de Salt *et al.*, (1995) montrent une faible mobilité au-delà du pH 7 indépendamment du fait que l'échantillon contient du borax ou non. Cette faible mobilité correspond à une facilité de floculation des contaminants. Enfin, le PEI est connu pour être non toxique à faible concentration, ce qui lui confère un avantage non négligeable dans la démarche de bioraffinerie.

Les méthodes chimiques de fractionnement sont connues pour être assez efficaces dans la purification des composés d'intérêts. Cependant elles sont parfois difficiles à extrapoler à l'échelle pilote voire industrielle. En outre elles nécessitent souvent une élimination des composés chimiques en aval.

Les méthodes disponibles afin de lyser les cellules de microalgues, puis d'extraire et de séparer/purifier leurs constituants sont donc multiples. Par ailleurs, il est impossible de définir un schéma d'enchaînement d'opérations unitaires extrapolables à toutes les souches de microalgues. En effet, selon les microalgues, les caractéristiques biochimiques de la cellule et de ses composés ont un impact sur le choix des techniques à mettre en œuvre.

6. Choix de la souche de microalgues

Le choix de la microalgue destinée à la bioraffinerie s'établit sur la base de différents critères (Hu *et al.*, 2008; Mata *et al.*, 2010) sur lesquels il faut parfois faire des compromis :

- Synthèse et accumulation d'une quantité intéressante de lipides neutres/huile (entre 20 et 50% de sa biomasse sèche) pouvant être convertis en biodiesel,
- Croissance relativement rapide, permettant des rendements de production élevés,
- Production de composés à haute valeur ajoutée tels que des biopolymères, protéines, polysaccharides, pigments, et marchés associés.

Ces 3 critères semblent les plus importants. Cependant d'autres peuvent aussi entrer en ligne de compte :

- Capacité à utiliser pour sa croissance des nutriments tels que l'azote ou le phosphore issus d'eaux usées par exemple
- Participer à la baisse des gaz à effet de serre par captation du CO₂

De nombreuses souches (principalement des chlorophytes) ont fait l'objet d'études pour la production de biodiesel, avec pour critère principal la teneur en lipides. Néanmoins, toutes ne sont pas de bons candidats à la mise en place d'une démarche de bioraffinerie car ne présentant pas de composés à haute valeur ajoutée par exemple. Par ailleurs, il est nécessaire de choisir une souche pour laquelle un minimum de connaissances a déjà été établi quant à leur composition.

Ainsi, quatre souches répondant à ces critères sont présentées dans les paragraphes suivants (*Botryococcus braunii*, *Dunaliella salina*, *Nannochloropsis oculata* et *Haematococcus pluvialis*). Chacune des souches présélectionnées contient les 4 principales fractions (lipides, pigments, protéines, polysaccharides). Ces fractions non lipidiques vont pouvoir être valorisées après leur extraction, l'objectif final étant de pouvoir raffiner l'ensemble de la microalgue. Le choix définitif de la souche de travail sera fait en prenant en compte, en plus des paramètres cités plus haut, la disponibilité de la biomasse ainsi que son coût.

6.1. *Botryococcus braunii*

Botryococcus braunii est une microalgue verte, retrouvée dans divers milieux de croissance aqueux telle que l'eau douce et saumâtre. Cette microalgue compte 3 races distinctes qui ont chacune leur particularité. La race A produit des molécules carbonées extracellulaires avec un nombre de carbones qui varie entre 25 et 31. Ces molécules organiques nommées alcadiènes sont des alcènes polyinsaturés à applications pharmaceutiques et cosmétiques (Mendes *et al.*, 2003). La race B synthétise des hydrocarbures triterpénoïques connus sous le nom de botryococcènes et enfin la race L fournit une molécule en C40 appelée lycopadiène.

Dans leur milieu de croissance, les cellules de *B. braunii* sont noyées dans une matrice extracellulaire commune qui est imprégnée d'huiles et d'exsudats cellulaires. Elles sont fixées les unes aux autres par un matériau réfringent qui relie parfois deux ou plusieurs touffes distinctes de cellule. La paroi de chaque cellule possède une couche interne fibrillaire en polysaccharide et une gaine externe trilaminaire composée d'un polymère insoluble, non hydrolysable et hautement aliphatique (algaenane). Cette molécule, du fait de son épaisseur et de sa résistance, rend la paroi de la microalgue difficilement lysable.

En somme, la synthèse d'hydrocarbures rend cette souche intéressante pour la production de bioénergie. La localisation extracellulaire de ses molécules lipidiques est une particularité qui confère un avantage non négligeable à *Botryococcus*. En outre, elle excrète une fraction polysaccharidique dans son milieu de croissance sous certaines conditions particulières de culture. La concentration en exopolysaccharides produits peut atteindre 4,5 g/L (Fernandez *et al.*, 1989). Il faut noter que cette teneur en exopolysaccharide a été atteinte par une souche naturelle associée à une cellule bactérienne. La question est de savoir si la microalgue sans la présence de la bactérie peut produire une telle quantité de polysaccharides.

De fait cette souche est reconnue comme étant un producteur potentiel d'hydrocarbures liquides. Sa fraction lipidique avec une teneur élevée en acide oléique fait d'elle l'une des meilleures candidates pour la production de biodiesel, sans compter sa teneur en molécules polysaccharidiques (Lee *et al.*, 2010) En ce qui concerne sa paroi rigide, des travaux antérieurs ont démontré que l'utilisation de certaines méthodes de lyse cellulaire, notamment les microondes, permettent d'y venir à bout (Lee *et al.*, 2012).

6.2. *Dunaliella Salina*

Cette microalgue pousse dans des milieux salins, tolère des températures élevées et est dépourvue de paroi rigide. *Dunaliella* est surtout connue pour sa capacité à accumuler des carotènes au cours d'un stress environnemental. Au travers des études déjà effectuées sur cette souche, il a été déterminé que le beta-carotène ou provitamine A est la principale molécule synthétisée lors de conditions stressantes chez *Dunaliella salina*. A l'instar des autres caroténoïdes, le β -carotène occupe une place importante dans certaines industries avec des applications en médecine, en nutrition ainsi qu'en alimentation en tant que colorant. En outre, ce pigment possède des propriétés antioxydantes (Mendes *et al.*, 2003).

Le β -carotène n'est pas l'unique molécule d'intérêt chez cette souche. La microalgue produit des quantités importantes de polysaccharides extracellulaires lorsqu'elle est cultivée en milieu

hypersalin (~1 g/L à 5 M en NaCl). Ses exopolymères suscitent un grand intérêt du fait de leur application possible en tant que biosurfactant et bioémulsifiant (Mishra *et al.*, 2009). Elle produit aussi du glycérol qui est largement utilisé dans l'industrie chimique. Il est inclus dans la conception de produits à usage quotidien tel que les dentifrices et est aussi utilisé en alimentation et en cosmétique, dans des matériels d'emballage.

Pour toutes ces raisons, *Dunaliella* pourrait être un bon candidat pour la mise en place d'une bioraffinerie. L'absence de paroi étant un atout non négligeable, notamment pour la facilitation des étapes d'extraction de certaines molécules intracellulaires. Le principal inconvénient de cette souche serait son prix. Le fait qu'elle synthétise du beta-carotène, produit à haute valeur ajoutée, rend son prix de vente plus élevé par rapport aux autres souches d'intérêt.

6.3. *Nannochloropsis oculata*

Nannochloropsis est un genre appartenant au groupe des *Eustigmatophyceae*. Cette microalgue marine unicellulaire est aussi capable de se multiplier dans de l'eau douce ou saumâtre. Comme toutes les microalgues, elle synthétise des pigments dont les caroténoïdes et la chlorophylle *a*. Cependant toutes les espèces appartenant à ce genre, dont *N. oculata*, sont dépourvues de chlorophylle *b*.

Nannochloropsis oculata est considérée comme une souche oléagineuse du fait de sa teneur élevée en lipides. Rodolfi *et al.* (2009) ainsi que beaucoup d'autres auteurs la considèrent comme le meilleur candidat à la production de biodiesel. Il faut noter que la synthèse des molécules de lipides neutres qui sont les substrats de base du biodiesel s'accroît au cours d'une carence en azote. Le stress induit permet à la fois de modifier la nature des lipides synthétisés, et d'augmenter leur teneur intracellulaire (Bondioli *et al.*, 2012). Dans les conditions optimales de croissance, la souche a tendance à produire des molécules lipidiques polaires donc saponifiables et non transformables en biodiesel.

L'intérêt de cette souche ne se limite pas à la production de lipides à vocation bioénergétique, *Nannochloropsis* synthétise aussi des acides gras polyinsaturés (PUFA). Lorsqu'ils sont insaponifiables, les PUFA sont utilisés dans la cosmétique (Bondioli *et al.*, 2012). En outre, on retrouve dans la composition de ce groupe des acides gras essentiels : ARA (acide arachidonique (20 :4w6), LA (acide linoléique ; 18 :2w6) et l'EPA (acide ecosapentaénoïque ; 20 :5w3) (Mata *et al.*, 2010 ; Reboloso-Fuentes *et al.*, 2001). Ce dernier est pressenti pour une utilisation dans le domaine pharmaceutique mais aussi alimentaire en tant que supplément (Brennan et Owende, 2010 ; Spolaore *et al.*, 2006 ; Wen et Chen, 2001). Le genre

Nannochloropsis compte des espèces disposant d'une paroi cellulaire polysaccharidique. La molécule de glucose domine dans la composition de ces polymères. Enfin, une activité antioxydante liée aux pigments a été mise en évidence, en particulier zeaxanthine et canthaxanthine.

Ainsi cette microalgue a une teneur non négligeable en lipides avec des applications possibles dans le domaine de la pharmacutique, du cosmétique, de la bioénergie ainsi que de l'alimentation. Elle produit des exopolysaccharides sulfatés qui présentent des propriétés antibactériennes entre autres et enfin elles sont des sources d'acides aminés essentiels (EPA) (Gouveia *et al.*, 2008 ; Reboloso-Fuentes *et al.*, 2001 ; Guzman-Muril et Ascencio, 2000).

6.4. *Haematococcus pluvialis*

Haematococcus pluvialis est une microalgue unicellulaire, biflagellée, eucaryote et de couleur verte. On la retrouve naturellement dans les eaux douces. Elle a une vitesse de croissance faible ainsi qu'un cycle de vie complexe. Néanmoins elle suscite un grand intérêt pour sa production d'astaxanthine. Cette molécule est un pigment, de nature lipidique avec une grande valeur ajoutée. Ce caroténoïde aux propriétés antioxydante et colorante est produit en quantité significative lorsque la microalgue est soumise à des conditions stressantes : un excès de lumière, de sel ou une carence en azote. Sous ces conditions, *Haematococcus pluvialis* synthétise ce pigment et le stocke dans des globules gras (Batista *et al.*, 2011 ; Damiani *et al.*, 2010 ; Reboloso-Fuentes *et al.*, 2001).

L'état de stress imposé à la microalgue provoque un enkystement de la cellule. Pour se protéger, la cellule eucaryote recouvre sa membrane d'une gaine trilaminaire constituée d'une molécule épaisse et très résistante proche de l'algeanane. Cependant elle emprisonne la cellule d'*Haematococcus* et réduit la biodisponibilité de l'astaxanthine, ce qui rend difficile son extraction (Park *et al.*, 2011 ; Damiani *et al.*, 2010). Mais à l'instar de *B. braunii*, un broyage mécanique peut venir à bout de cette barrière (Safi *et al.*, 2014b).

Il faut noter que ces stress environnementaux, bien qu'ils rendent difficile la mise en œuvre de la microalgue, ont un effet bénéfique. Ils sont à l'origine de la synthèse lipidique, notamment de TAG et de l'astaxanthine (Batista *et al.*, 2011).

6.5. Pré-sélection de la souche de travail

Afin d'évaluer le potentiel de chacune de ces souches, un tableau a été construit, reprenant les principales teneurs en composés pouvant être extraits et leurs applications éventuelles. Ces données sont présentées dans le Tableau 6.

A l'issue de cette étude rapide de la composition des 4 souches, *Dunaliella salina* est écartée car la teneur en lipides est trop faible. A l'inverse, *Botryococcus braunii* est capable d'accumuler de très grandes quantités de lipides, mais les autres composés risquent donc d'être retrouvés en trop faibles teneurs pour que la mise en place d'une bioraffinerie puisse être rentable économiquement. En ce qui concerne les deux dernières souches, leurs compositions sont équilibrées et assez similaires en terme de teneurs. Néanmoins, *Haematococcus pluvialis* a été retenue comme souche de travail. Tout d'abord il s'agit d'une microalgue peu étudiée comparé aux autres candidates à la bioraffinerie. Elle synthétise des TAG, matière première à la production de biodiesel, notamment lors d'une carence en azote. La microalgue contient aussi des teneurs en protéines et en sucres intéressante. Enfin elle produit en grande quantité un pigment (l'astaxanthine) dont la valeur dépasse des milliers de dollars/ kg (entre 2500 et 7000 \$/kg) tandis que le coût de production est estimé à 1000 \$/kg (Li *et al.*, 2011) dépassant ainsi largement en valeur ajoutée toutes les microalgues précédemment cités. La possibilité d'obtenir la souche en France a aussi été une motivation supplémentaire pour choisir de travailler avec cette souche. Une étude bibliographique plus détaillée a donc été menée.

Tableau 6 Composition des microalgues d'intérêts et leurs applications

Souches	Composés d'intérêts				Applications	Références
	Protéines (%)	Lipides (%)	Glucides (%)	Pigments (%)		
<i>Botryococcus braunii</i>	?	29-75 %	?	?	Épaississant, antibactérien, antiadhésif, chélateur de métaux	Lee <i>et al.</i> , 2010 ; Ranga Rao <i>et al.</i> , 2007 ; Nguyen et Harvey, 2003 ; Banerjee <i>et al.</i> , 2002 ; Tran <i>et al.</i> , 2010
	Rubisco	Acides oléique, stéarique, linoléique palmitoléique, n-alkadienes, trienes, hydrocarbures	Exopolysaccharides (galactose, fucose, arabinose, rhamnose, acides uroniques), α -laminaribiose	Lutéine, carotène, violoxanthine, zéaxanthine, canthaxanthine, edonixanthine, echinenone		
<i>Dunaliella salina</i>	57 %	6-15 %	32 %	5 %	Émulsifiant, épaississant, gélifiant, surfactant, antioxydant, antimicrobien	Gouveia <i>et al.</i> , 2008 ; Avinash et Bhavanath, 2009 ; Becker, 2006 ; Herrero <i>et al.</i> , 2006 ; Guedes <i>et al.</i> , 2011
	Glycoprotéines, GTP binding protéines, protéines acétylées	Acides palmitique, linoléique oléique	Exopolysaccharides (galactose, glucose, xylose)	β -Carotène, lutéine		
<i>Nannochloropsis oculata</i>	28,8 %	~23 - 30 %	8 - 37,6 %	?	Alimentaire, antioxydant	Mata <i>et al.</i> , 2010 ; Reboloso-Fuentes <i>et al.</i> , 2001 ; Natrah <i>et al.</i> , 2007 ; Gonzalez-Fernandez et Ballesteros, 2012 ; Costa <i>et al.</i> , 2010
	aspartate, glutamate, proline, méthionine, tryptophane, cysteine, histidine, hydroxyproline	Acides arachidonique, linoléique, PUFA, EPA	Glucides	Zéaxanthine, carotene, violaxanthine vaucheraxanthine		
<i>Haematococcus pluvialis</i>	10,2 - 17,3 %	15 - 41 %	30,6 - 36,9 %	?	Nutraceutique, alimentaire, aquaculture, antioxydant, antimicrobien	Lee <i>et al.</i> , 2010 ; Batista <i>et al.</i> , 2011 ; Damiani <i>et al.</i> , 2010 ; Reboloso-Fuentes <i>et al.</i> , 2001 ; Hagen <i>et al.</i> , 2000 ; Rodriguez-Meizoso <i>et al.</i> , 2010 ; Ju <i>et al.</i> , 2012 ; Guedes <i>et al.</i> , 2011
	Acides aminés essentiels	Acides palmitique, stéarique, oléique, linoléique, linoléique, linolélaïdique, DHA, EPA	Glucides	Astaxantine, lutéine, cantaxanthine, beta-carotène		

6.6. La souche retenue : *Haematococcus pluvialis*

Comme vu précédemment, *Haematococcus pluvialis* est une microalgue verte, unicellulaire connue principalement pour sa capacité, dans certaines conditions, à synthétiser un pigment caroténoïdien nommé astaxanthine.

6.6.1. Taxonomie

Le genre *Haematococcus* a été décrit pour la première fois par Flotow en 1844. C'est une microalgue verte eucaryote dont l'habitat naturel est principalement aqueux (eau de sources). A ce jour, 7 espèces sont taxonomiquement classés dans ce genre et parmi lesquelles la plus étudiée est l'espèce *pluvialis*. La taxonomie complète de *Haematococcus pluvialis* se décline comme suit ([http\|: www.algaebase.com](http://www.algaebase.com) ; De reviers, 2003):

Embranchement: Chlorophyta

Classe : Chlorophyceae

Ordre : Chlamydomonadales

Famille : Haematococcaceae

Genre : *Haematococcus*

Espèce : *pluvialis*

6.6.2. Biologie

Haematococcus pluvialis a un mode de reproduction asexué avec une division des cellules végétatives en 4 ou 8 zoospores. La culture peut être réalisée au niveau industriel, généralement dans des «open race» ou dans des photobioréacteurs tubulaires. Trois cent tonnes de matière sèche de cette microalgue sont produits par an, et principalement exploités pour sa teneur en astaxanthine comme aliment destiné à l'aquaculture (Pulz et Gross, 2004; Spolaore *et al.*, 2006). Cette microalgue a un mode de croissance photo-autotrophique avec une source de carbone inorganique (CO₂). Des essais de croissance en mixotrophie ainsi qu'en hétérotrophie avec l'acétate comme substrat organique ont été réalisés mais ces modes de croissances sont plus adaptés à la production de biomasse qu'à la caroténogénèse (Hong *et al.*, 2015).

6.6.3. Croissance et Changements morphologiques

H. pluvialis a un cycle de vie complexe du fait des changements morphologiques et physiologiques que subit la microalgue. Ces variations sont le résultat de stress imposés à la

cellule à travers des modifications de paramètres physiques ou chimiques du milieu de culture. Elles induisent chez la cellule une modification du profil moléculaire assez nette.

Kobayashi *et al.*, (1997) ont distingué 4 phases de croissance chez *H. pluvialis*:

- 1. la phase de croissance végétative,
- 2. la phase d'enkystement,
- 3. la phase de maturation,
- 4. la phase de germination.

Ces 4 phases peuvent être résumées en deux phases majeures : la phase végétative et la phase de repos dans laquelle sont classées les phases 2, 3 et 4 précitées. Les cellules de *H. pluvialis* au repos peuvent être oranges ou rouges en fonction de la quantité de pigments caroténoïdiens synthétisés et accumulés.

Les cellules de *H. pluvialis* sous leur forme végétative sont cultivées dans des conditions contrôlées et optimales. Au cours de la phase végétative, elles ont une forme ovale voire ellipsoïdale et sont dotées de deux flagelles leur permettant d'être mobiles. Il s'agit aussi de la phase durant laquelle la biomasse s'accumule et où l'activité photosynthétique est maximale. Elle s'accompagne d'une forte production des molécules chlorophylliennes *a* et *b*. Les thylacoïdes forment une membrane continue autour d'éventuelles granules d'amidon présentes dans le milieu intracellulaire.

Une phase intermédiaire est reportée entre la phase végétative et celle de repos et qui correspond à une phase d'acclimatation aux conditions de stress. Elle est induite par une carence en nitrate et/ou en phosphate, un excès de température, d'irradiance, ou de concentration en sels. Dans les stades préliminaires de stress, les cellules sont sous forme de palmelloïdes, colonies cellulaires regroupées et entourées d'un film mucilagineux. Les cellules ont une reproduction asexuée qui leur permet de passer de 8 à 32 zoospores. Les principales différences avec les cellules végétatives sont la perte des flagelles ainsi qu'un début d'accumulation de caroténoïdes. Au bout de 24 à 48 heures, la phase de repos est amorcée, la croissance cellulaire se stoppe et des changements significatifs intra et extracellulaires débutent. Les cellules stressées grossissent, leur diamètre passe de 16 à 50 μm . Cette expansion cellulaire s'accompagne de la formation d'une paroi cellulaire très résistante ainsi que d'une matrice extracellulaire gélatineuse. La prise en volume des cellules est en partie liée à la formation de « gouttes d'huile » dans le cytoplasme. Ce sont des globules ou corps lipidiques au sein desquels est stocké l'astaxanthine, des lipides majoritairement neutres, ainsi que de l'amidon.

Ce dernier est sous forme de granules au sein de la cellule tandis que la membrane des thylacoïdes qui les entourent affiche une nette régression de volume.

Haematococcus pluvialis avec sa richesse en composés d'intérêts (protéines, sucres, lipides et surtout pigments caroténoïdiens) semble donc être un bon candidat à la bioraffinerie. De plus sa particularité à varier son profil moléculaire en fonction de la couleur est un atout supplémentaire. Ainsi la forme verte riche en protéines et en chlorophylle pourrait être orientée vers une valorisation dans le domaine alimentaire. En ce qui concerne la forme rouge riche en lipides, en pigments caroténoïdiens et en sucres, des applications en énergétiques (biodiesel, bioéthanol), en cosmétique voire en nutraceutique ou en pharmaceutique sont envisageables (Boussiba, 2000 ; Montsant *et al.*, 2001, Gu *et al.*, 2013, Lopez *et al.*, 2006 ; Boussiba *et al.*, 1992). Néanmoins, la présence de sa paroi rigide imposera une lyse mécanique poussée. Par ailleurs, le pigment d'intérêt étant de nature lipophile, l'un des défis de la bioraffinerie d'*H. pluvialis* résidera dans la séparation de ces deux types de composés.

7. Conclusion à la synthèse bibliographique

En conclusion, les biocarburants issus des microalgues sont reconnus comme étant l'avenir dans le domaine énergétique. Cependant l'inconvénient majeur reste leur prix trop élevé pour être compétitif par rapport à ceux des générations précédentes et des énergies fossiles. A ce jour, une valorisation globale des fractions de microalgues est une solution crédible pour contourner ce problème.

Le choix de la souche inclut une étape de screening qui reste consommateur en temps au vu de l'existence d'un grand nombre de microalgues. C'est la raison pour laquelle le choix est le plus souvent orienté vers une souche connue et déjà étudiée. Dans le cadre de cette étude, la préférence est allée à *Haematococcus pluvialis*, une microalgue qui par sa taxonomie, sa biologie et sa composition semble être un candidat pertinent à la bioraffinerie.

En ce qui concerne les méthodes de lyse, les méthodes de lyse chimiques seront écartées. Il ressort de la bibliographie que leur efficacité repose grandement sur le type d'échantillon ce qui implique qu'elles seront difficilement répétables. Par ailleurs, l'ajout de composés (détergents, antibiotiques) entraîne l'introduction de « contaminants » qui devront être éliminés. Enfin, même si leur consommation énergétique est très limitée, leur efficacité modérée n'est pas adaptée à la lyse d'*Haematococcus pluvialis* qui possède une paroi très résistante. Les méthodes

de lyses mécaniques ou mécaniques sont donc les mieux adaptées à la bioraffinerie d'*H. pluvialis*. Ce sont des méthodes robustes, et facilement extrapolables à l'échelle industrielle. Elles s'accordent avec des échantillons qui ont une concentration en matière sèche élevée. De plus elles sont exemptes de contaminants comparées aux lyses chimiques. Cependant il ne s'agit pas de méthodes sélectives, il faudra donc sélectionner un / des procédés de séparation et de fractionnement adaptés. Néanmoins cet inconvénient pourrait être un atout car cela permet d'élargir les souches de microalgues que l'on peut lyser par ces méthodes mécaniques. Enfin il y a quand même un risque de dénaturation de certains composés thermosensibles lors de ce procédé. Le refroidissement du système de lyse tout au long de la fragilisation de la cellule est donc indispensable. En termes de consommation énergétique, notre étude bibliographique a montré que les 3 méthodes les plus économes sont le broyage à billes, les microondes (à condition qu'ils soient conduits en présence de solvants), et l'homogénéisation à haute pression.

En ce qui concerne les procédés d'extraction de la fraction liposoluble, nous disposons de 3 alternatives : utilisation de solvants, de fluides supercritiques, et de liquides ioniques. Les liquides ioniques, s'ils présentent de nombreux avantages, ont cependant un coût extrêmement élevé et une toxicité limitante. Les fluides supercritiques présentent l'avantage de pouvoir être conduits directement sur la biomasse ce qui élimine l'étape de lyse. Néanmoins, il s'agit d'un procédé coûteux, qui nécessite une biomasse sèche (et donc une étape de séchage consommatrice en énergie après récolte de la biomasse) et qui peut entraîner une dénaturation des autres fractions. Par ailleurs, nous ne disposons pas d'un tel équipement sur le site de Clermont-Ferrand. Dans le cadre de cette étude, nous avons donc retenu la méthode d'extraction aux solvants, facile à mettre en œuvre et peu coûteuse.

Enfin, pour les étapes de fractionnement / purification, il n'est pas possible à l'issue de cette synthèse bibliographique de définir une « méthode idéale » car nous ne disposons pas de suffisamment d'éléments concernant la nature biochimique précise des composés. Différentes méthodes seront donc testées.

L'objectif de ce travail de thèse sur la bioraffinerie d'*Haematococcus pluvialis* sera donc d'étudier différents procédés, en aval de la production de biomasse microalgale, avec pour objectif final de proposer un enchaînement d'opérations unitaires permettant d'extraire, de purifier et de valoriser chacune des fractions. Il sera donc nécessaire d'établir la composition générale en molécules d'intérêts de la souche, mais également de caractériser plus finement chacune des fractions afin d'orienter notre choix de procédés à mettre en œuvre. Les conditions de lyse et d'extraction optimales des composés d'*Haematococcus pluvialis* devront être établies

avant de tester différentes méthodes de purification. Ces méthodes devront permettre dans un premier temps de séparer les fractions hydrosolubles et liposolubles, mais également de séparer les lipides et les pigments, ce qui est certainement le principal challenge de la bioraffinerie d'*H. pluvialis*. La valorisation des certains composés en tant qu'agent fonctionnel et leur comparaison à des références seront présentés. Enfin un enchaînement de procédés sera proposé.

II. Matériels et méthodes

Dans un premier temps, ce chapitre présente les méthodes mises en œuvre pour extraire et caractériser les différentes fractions de composés synthétisés par *Haematococcus pluvialis*. Les formes d'*Haematococcus pluvialis* sont décrites ainsi que les protocoles de quantification des principales fractions d'intérêts : protéines, sucres, pigments et lipides. Un intérêt particulier est apporté aux paramètres opératoires qui ont un impact sur la méthode de lyse cellulaire et les rendements d'extraction des composés intracellulaires. Tout d'abord, la méthode de concentration des molécules hydrosolubles par ultrafiltration est décrite. Ensuite, les méthodes de séparation/purification des molécules hydro- et liposolubles sont présentées. Ces dernières mettent en œuvre la précipitation par des ajouts de composés chimiques (PEI et sulfate d'ammonium) ainsi que de la chromatographie de partage centrifuge (CPC).

Enfin, ce chapitre porte également sur les protocoles d'évaluation des propriétés émulsifiantes des extraits d'*Haematococcus pluvialis*.

1. *Haematococcus pluvialis*

La forme verte (HPV) et la forme rouge (HPR) d'*Haematococcus pluvialis* (Figure 18) ont été utilisées dans ce travail. Les biomasses proviennent de l'entreprise Microphyt (Baillargues, France). Elles sont commercialisées sous forme de pâtes congelées avec une teneur en matière sèche d'environ 20 % ce qui constituent un « prétraitement » qui fragilise la structure cellulaire.

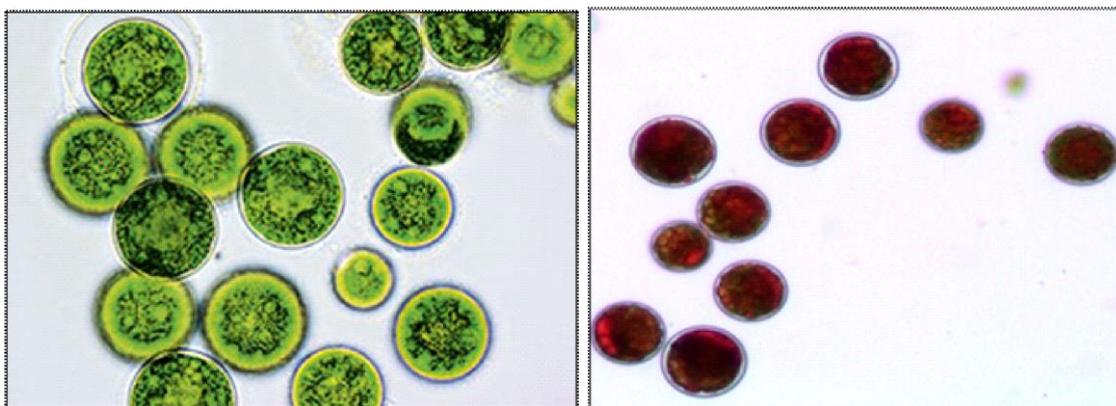


Figure 18 *Haematococcus pluvialis* verte et rouge. Grossissement x 200.

(http://www.schott.com/magazine/english/sol114/sol114_04_photobioreaktor.html)

2. Caractérisation de la biomasse

2.1. Teneur en matière sèche

Pour déterminer la teneur en matière sèche des pâtes de microalgues reçues, une certaine masse est aliquotée puis congelée pendant au moins 12 heures à -80°C . Les deux formes de *H. pluviialis* sont ensuite séchées 48 heures dans un lyophilisateur (Heto Power Dry PL6000-90, Thermo Electron), réglé à un vide de 0,03 hPa, et équipé de plateaux chauffants, réglés à -5°C pendant 10 h, puis successivement, 10 h à 0°C , 10 h à 10°C , 10 h à 25°C , et enfin 30°C jusqu'à l'arrêt du cycle. Pour finir, la teneur en matière sèche est calculée par différences de masses.

2.2. Composition élémentaire

La composition élémentaire des deux biomasses d'*Haematococcus pluviialis* a été déterminée par le Service Central d'Analyse du CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) (Solaize, France). A partir d'une masse donnée de biomasse sèche, les composés organiques (C, H, N, et O) et inorganiques sont quantifiés par microanalyse élémentaire de la biomasse (<http://www.sca.cnrs.fr/IMG/analyse/RCorganique/RC-E2-130.pdf>).

Tous les composés organiques sont déterminés après minéralisation de la biomasse à des températures comprises entre 1000 et 1100°C .

Dans le cas du Carbone et de l'Hydrogène, après la combustion totale de l'échantillon sous courant d'hélium/oxygène et sous pression, le carbone et l'hydrogène sont transformés en dioxyde de carbone et en eau respectivement. Ils sont séparés par une colonne chromatographique puis mesurés par un détecteur à conductivité thermique. En ce qui concerne l'azote, il est transformé en divers oxydes d'azote puis réduits en azote moléculaire avant d'être quantifié par conductivité thermique. L'oxygène est obtenu après pyrolyse de l'échantillon à 1080°C sous flux d'azote puis il est transformé en monoxyde de carbone par passage sur du charbon actif à 1120°C . Le monoxyde de carbone est quantifié par détecteur spécifique à infrarouge CO. La quantification des éléments inorganiques débute par une minéralisation de l'échantillon à plus de 1000°C puis ils sont estimés grâce à un détecteur spécifique à infrarouge.

Les valeurs obtenues sont exprimées en pourcentage de matière sèche de biomasse microalgale.

3. Quantification et caractérisation des composés

3.1.Sucres

3.1.1. Hydrolyse acide

L'hydrolyse acide permet de cliver l'ensemble des polymères de sucres contenus dans la biomasse de *H. pluvialis* en monosaccharides. Ces derniers sont dosés par une méthode colorimétrique et analysés par la suite par une chromatographie échangeuse d'ions. La méthode de lyse mise en œuvre sur la biomasse sèche d'*H. pluvialis* se déroule comme suit : Dix mg d'échantillon sec sont mélangés à 1 mL d'acide trifluoroacétique (ATF) à 4 M. L'hydrolyse se tient pendant 8 heures dans un bain à sec réglé à 100°C. Au terme de ces 8 h, les hydrolysats sont neutralisés avec de l'ammoniaque 16,5 M, après retour à température ambiante.

3.1.2. Oses totaux

Il s'agit d'un dosage au résorcinol basé sur le protocole de Monsigny *et al.* (1988). Les liaisons glycosidiques dans l'échantillon sont hydrolysées à chaud en présence d'acide sulfurique. La déshydratation des unités osidiques entraîne la formation de composés furfuriques qui à leur tour réagissent avec le résorcinol. Les produits obtenus par condensation sont quantifiés par un dosage colorimétrique.

Une solution de résorcinol est préparée à 6 g/L. Dans un tube, 200 µL de cette solution sont mise en contact 200 µL de l'échantillon à doser et 1 mL d'acide sulfurique à 80 % (m/v). Le mélange est incubé à 90°C pendant 30 minutes, puis refroidit à l'abri de la lumière pendant 30 minutes. De l'eau ultra pure (1,4 mL) est ajouté au milieu réactionnel après refroidissement puis l'absorbance est lue à 450 nm (spectrophotomètre UV-Vis CPS-240 A, Shimadzu). Une gamme étalon est réalisée à partir d'une solution mère de glucose à 0,5 g/L et les résultats sont exprimés en équivalent glucose.

3.1.3. Dosage de groupements sulfates

Le taux de sulfatation d'un polysaccharide (groupements SO_3^-) peut être estimé grâce à un dosage par turbidimétrie. Le protocole de Dodgson et Price (1962) utilise du BaCl_2 et de la gélatine.

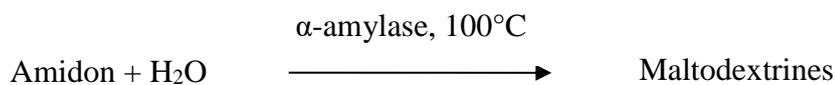
Cent cinquante mg de gélatine sont dissous dans 50 mL d'eau ultra pure à 70°C. La solution obtenue est refroidie pendant 16 h à 4°C puis 0,5 g de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y sont rajoutés. Cent vingt mg de l'échantillon de polysaccharide à doser sont hydrolysés en présence d'acide

chlorhydrique 2 M pendant 2 heures à 100°C. L'hydrolysate est centrifugé à 13 000 g pendant 30 minutes et à température ambiante. Un mL du surnageant est mis en contact avec 9 mL d'eau ultra pure, 1 mL de HCl à 0,5 M et 0,5 mL de la solution de gélatine/BaCl₂ préalablement préparée puis les tubes sont vortexés. Les ions sulfates issus de l'hydrolyse des polysaccharides réagissent au contact de la gélatine et du chlorure de baryum pour former un précipité de sulfate de baryum. Au bout de 30 minutes à température ambiante, l'absorbance est lue à 550 nm. La gamme étalon est réalisée à partir d'une solution de sulfate de potassium (3 mg/mL) et les résultats sont exprimés en équivalent SO₃⁻.

3.1.4. Amidon

L'amidon est le polysaccharide de réserve de *Haematococcus pluvialis* ainsi que de la majorité des algues vertes. Le dosage de ce polysaccharide intracellulaire est réalisé selon la méthode enzymatique décrite par McCleary *et al.* (1994). Les étapes suivies sont validées par la norme AOAC 996.11.

Cent mg de l'échantillon sont mis en contact avec 0,2 mL d'éthanol (80 % v/v) puis 3 mL d' α -amylase thermostable (300 U) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est ensuite incubé dans un bain marie à 100°C pendant 6 minutes avec une agitation du milieu réactionnel toutes les 2 minutes. A cette étape, l'amidon est hydrolysé en maltodextrines selon l'Équation 4. A la sortie du bain marie, la température du mélange est stabilisée à 50°C puis 0,1 mL d'amyloglucosidase (330 U) sont ajoutés et l'incubation est poursuivie pendant 30 min à 50°C. L'amyloglucosidase clive les maltodextrines, néoformées par l' α -amylase, en D-glucose par coupure des liaisons α -(1,4).



Équation 4 Hydrolyse enzymatique de l'amidon en maltodextrines par de l' α -amylase

Le mélange réactionnel est ensuite transvasé dans une fiole de 100 mL et le volume est ajusté avec de l'eau ultra pure. Après agitation, 1 mL est prélevé et centrifugé à 3000 g pendant 10 minutes. Le surnageant, à raison de 0,1 mL, est mélangé à 3 mL du réactif GOPOD (composé de phosphate de potassium 0,26 M à pH 7,4, d'acide p-hydroxybenzoïque 0,22 M et d'azide de sodium 0,4 % m/v ; Glucose oxydase 36 U et Péroxydase 195 U) puis incubé à 50°C pendant 20 minutes. Un témoin de D-glucose est réalisé avec 0,1 mL de D-glucose

(1 mg/mL) et 3 mL de réactif GOPOD. Les blancs sont constitués d'eau distillée et du réactif GOPOD. L'absorbance de chaque échantillon est mesurée à 510 nm contre les blancs. La teneur en amidon est calculée selon l'Équation 5 :

$$\% \text{ amidon} = \Delta A \times F \times VF / 0,1 \times 1/1000 \times 1/W \times 162/180$$

Équation 5 Calcul de la teneur en amidon issu d'un échantillon sec

Où

ΔA = absorbance obtenue après lecture contre le blanc

F = 100 (μg D-glucose) / absorbance pour 100 μg de D-glucose

VF = volume final (100 mL)

0,1 mL = volume du surnageant analysé

1/1000 = conversion de μg en mg

100/W = facteur pour exprimer le pourcentage d'amidon dans la poudre analysée

W = poids en milligramme de l'échantillon en poudre analysé

162/180 = ajustement du D-glucose libre au D-glucose anhydre

3.1.5. Fibres alimentaires

Les polysaccharides fibrillaires sont des composés cellulaires non digestibles par les enzymes humaines. Il s'agit par exemple de la cellulose, hémicellulose, lignine ainsi que d'autres substances mineurs tels que la cutine entre autre (Trowell, 1976). Le dosage de ces substances fibreuses est réalisé par la méthode développée par McCleary (2007) à l'origine de la norme internationale AOAC 2009.01. Elle est basée sur la solubilité différentielle des fibres polysaccharidiques. Lors de cette analyse, les protéines sont préalablement éliminées par digestion enzymatique. La Figure 19 décrit les principales étapes de cette procédure. Cette méthode permet également d'estimer les fibres solubles et insolubles.

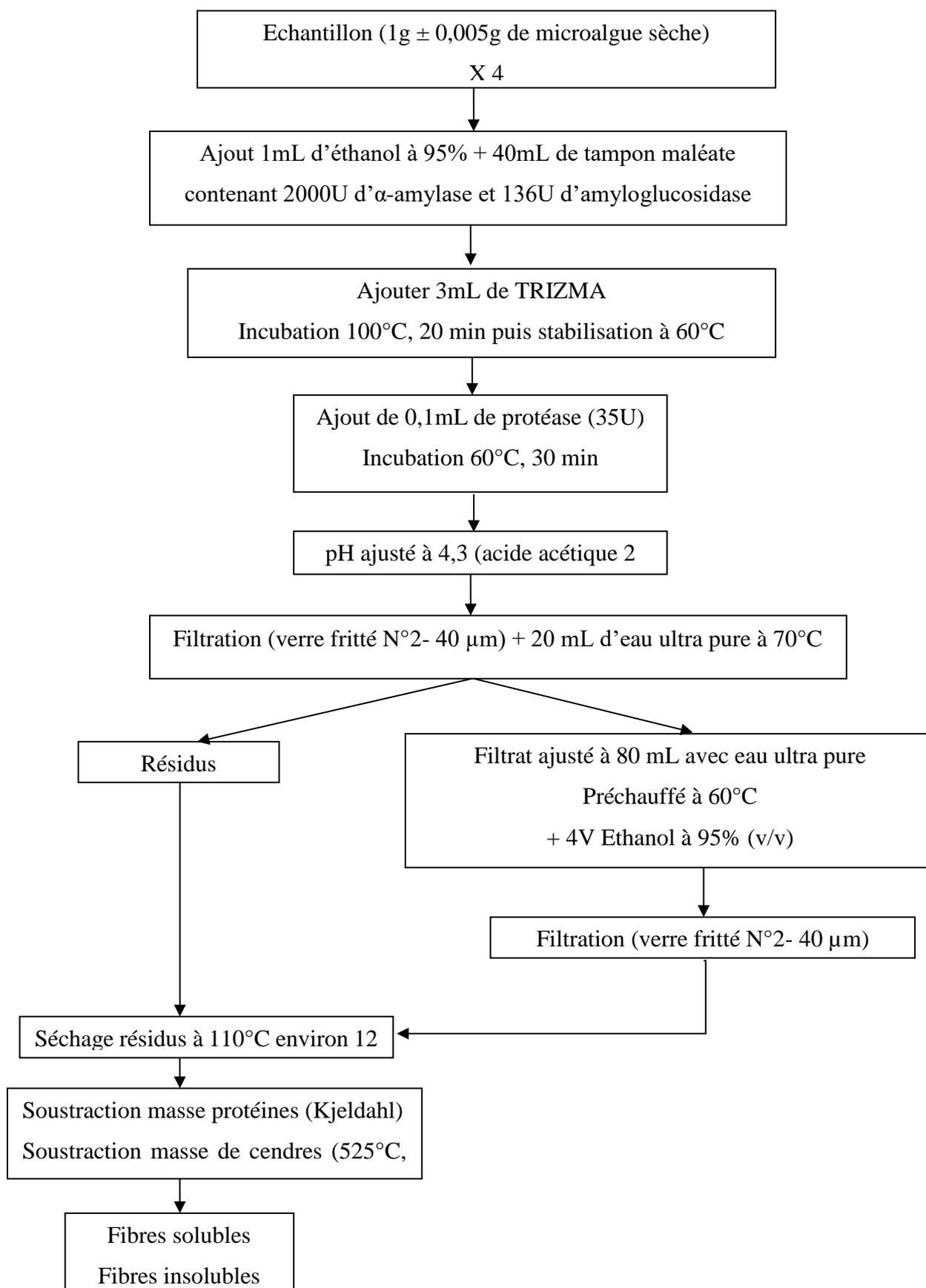


Figure 19 Protocole de quantification des fibres (solubles et insolubles)

Le calcul de la teneur en fibres solubles et insolubles (mg/100g) se fait selon l'Équation 6 :

$$\text{Masse fibres (g/100g)} = \{(((R1+R2)/2)-PB-PA-B) / ((M+M2)/2)\} \times 100$$

Équation 6 Calcul de la teneur en fibres

Où :

R1 = résidu 1 de l'échantillon 1 en mg ;

R2 = résidu 2 de l'échantillon 2 en mg;

M1 = masse initiale de l'échantillon 1 ;

M2 = masse initiale de l'échantillon 2;

PA = masse des protéines de R1;

PB = masse des cendres de R2;

B = masse des résidus des blancs.

3.1.6. Polysaccharides matriciels et fibrillaires

Les polysaccharides de ces deux familles sont obtenus par extraction aqueuse selon une procédure adaptée de la méthode décrite par Ramus (1972). Cette méthode permet l'extraction différentielle et la quantification des polysaccharidiques matriciels et fibrillaires. L'extraction est basée sur leur solubilité variable en présence de détergent et de solvants polaires. Elle se déroule en 3 étapes : la dépigmentation de la biomasse microalgale, l'extraction aqueuse à chaud des polysaccharides matriciels et enfin une étape de purification des polysaccharides fibrillaires par précipitation alcoolique. Les différentes étapes sont détaillées dans les paragraphes suivants et un schéma récapitulatif est présenté sur la Figure 20.

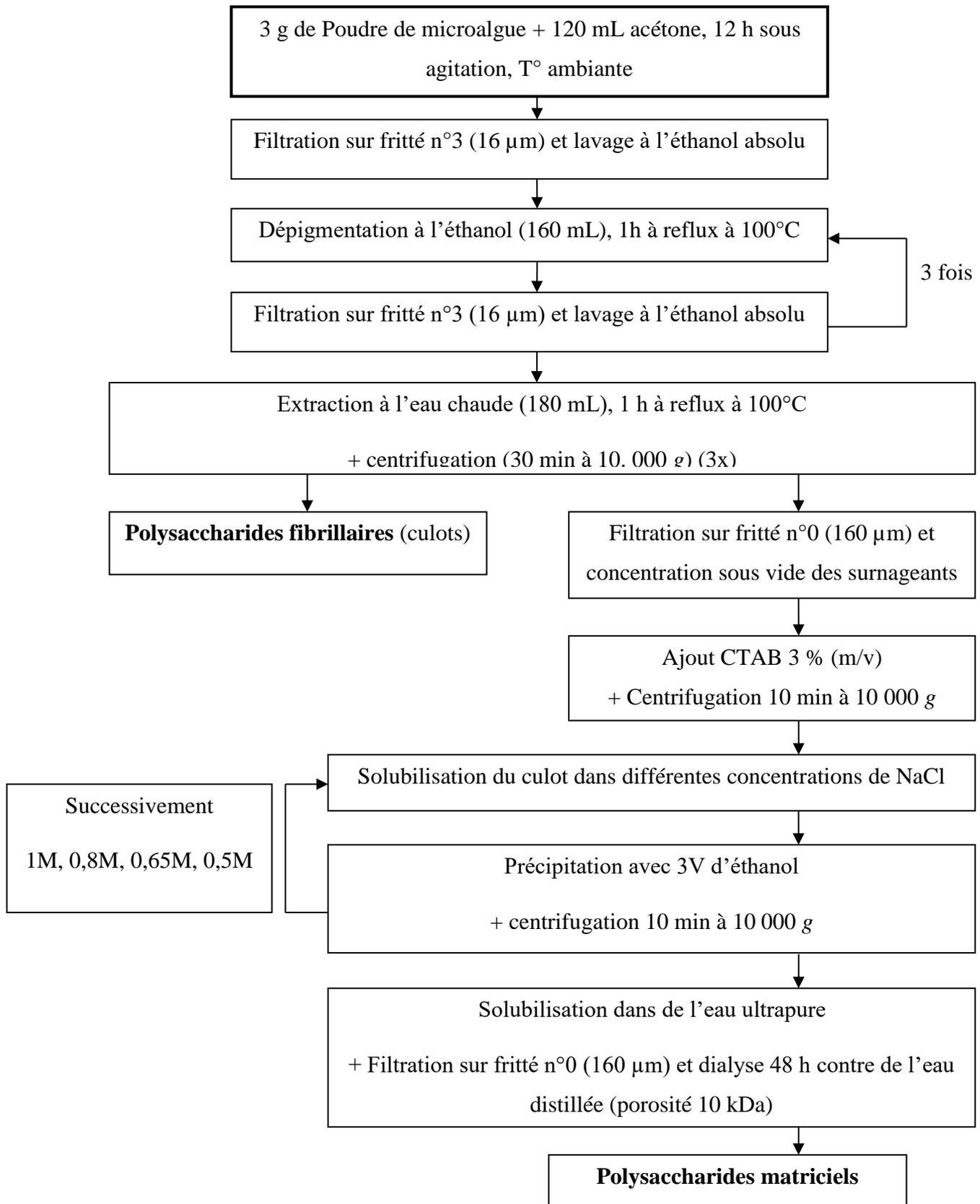


Figure 20 Schéma récapitulatif de l'extraction des polysaccharides matriciels et fibrillaires selon Ramus (1972)

3.1.6.1. Dépigmentation

Trois grammes de matière sèche sont placés dans 120 mL d'acétone à température ambiante durant 12 h sous agitation. Le mélange est filtré sur verre fritté de porosité 3 (16 µm) puis rincé par de l'éthanol absolu jusqu'à la disparition de la coloration verte ou orange correspondant à l'élimination des chlorophylles et des caroténoïdes. La dépigmentation se poursuit avec l'addition de 160 mL d'éthanol absolu au résidu puis le mélange est incubé à 100°C à reflux pendant 1 h. Cette étape est répétée 3 fois et entre chaque étape de dépigmentation, le résidu est lavé par de l'éthanol absolu puis filtré sous verre fritté de porosité 3 (16 µm). Le résidu final est séché à l'étuve (50°C) pendant 12 h puis pesé.

3.1.6.2. Extraction

L'extraction des polysaccharides est effectuée en présence de 180 mL d'eau distillée portés à 100°C à reflux pendant 1 h. Le mélange est ensuite centrifugé 30 minutes à 10 000g. Le culot correspondant aux polysaccharides fibrillaires est récupéré et extrait à chaud une nouvelle fois puis lyophilisé (48 heures). Les surnageants sont rassemblés et filtrés sur un verre fritté de porosité 0 (160 µm) afin d'éliminer les débris cellulaires résiduels.

3.1.6.3. Purification des polysaccharides matriciels

La phase polysaccharidique matricielle est concentrée sous vide (BUCHI) puis précipitée sélectivement par l'ajout d'un volume d'une solution de cetyltriméthylammonium bromide (CTAB) à 3 % m/v. Les polysaccharides anioniques ainsi précipités, sont purifiés par 4 cycles successifs de solubilisation dans des solutions de NaCl de concentrations décroissantes (1 M ; 0,8 M ; 0,65 M et 0,5 M), suivis d'une étape de précipitation par 3 volumes d'éthanol absolu. Le polysaccharide purifié est enfin dissous dans l'eau distillée, filtré, dialysé contre de l'eau distillée (seuil de coupure : 10 kDa) pendant 48 h.

3.1.7. Identification des monosaccharides

La composition en monosaccharides des glucides est déterminée par chromatographie échangeuse d'anions haute performance (CEAHP) après hydrolyse acide des échantillons à l'ATF. La chromatographie ionique est une ICS 3000 (Dionex Corporation, Sunnyvale (CA), USA), équipée d'un injecteur automatique (AS40), d'un module de pompe ainsi que d'un détecteur ampérométrique pulsé (CEAHP-DAP). L'acquisition et le traitement des résultats s'effectuent à l'aide du logiciel Chromeleon (6.8).

Les hydrolysats neutralisés sont filtrés à 0,22 µm puis injectés et élués à travers une pré-colonne et une colonne CarboPac PA1 (Dionex) dont les dimensions respectives sont de 4 x 50 mm et 4 x 250 mm. La colonne contient de la résine échangeuse d'anions faite de billes de polystyrène et de divinylbenzène sur lesquelles sont agglomérés des particules fonctionnalisées par des groupements d'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 monosaccharides issus d'hydrolysats de polysaccharides (ou de monosaccharides standards : L-Rha, D-Rib, L-Fuc, L-Ara, D-Xyl, D-Man, D-Gal, D-Glc, D-GalN, D-GlcN, D-GalNac, D-GlcNac, D-GlcA, D-GalA) sont transformés dans la phase mobile en alcoolates à des pH supérieurs au pKa de leurs fonctions hydroxyles (-OH → -O⁻). Quant à la phase mobile, il s'agit d'un gradient d'hydroxyde de sodium et d'acétate de sodium. Le compartiment colonne est thermostaté à 25°C et l'élution est réalisée à un débit de 1 mL/min. Le Tableau 7 récapitule les conditions d'élution utilisées.

Tableau 7 Gradient utilisé en CEAHP pour l'analyse des monosaccharides

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

Les différentes étapes de l'élution permettent dans un premier temps d'éluer les oses neutres (NaOH 18 mM), puis les oses acides (acétate de sodium 1 M et NaOH 200 mM). Le palier à 200 mM d'hydroxyde de sodium permet ensuite de régénérer la colonne, avant de la rééquilibrer pour l'injection suivante (NaOH 18mM).

Les monosaccharides, séparés lors de l'élution, sont oxydés à la surface d'une électrode en or, générant 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 (ampérométrie pulsée).

Les monosaccharides constitutifs des polymères d'*Haematococcus pluvialis* sont identifiés dans un premier temps par leurs temps de rétention puis par la méthode des étalons internes. Leur quantification est réalisée par report des aires des pics par rapport aux gammes étalons des standards correspondant.

3.2. Protéines

3.2.1. Extraction et quantification des protéines

3.2.1.1. Protéines totales et facteur de conversion azote/protéines

La diversité des membranes de microalgues rend la détermination de leur teneur totale en protéines problématique. Dans le cas où la membrane de la microalgue est épaisse ou composée de molécules résistantes à la méthode d'extraction mise en œuvre, la quantité en protéines totales est sous-estimée. Quant aux dosages colorimétriques, bien qu'assez précis, ils ne prennent en compte qu'une fraction des protéines : les hydrosolubles.

La méthode d'estimation la plus précise à ce jour somme l'intégralité des acides aminés contenus dans la microalgue. Les teneurs en acides aminés sont obtenus par une analyse qualitative et quantitative : l'aminogramme. Les analyses ont été effectuées par l'INRA de Theix. L'échantillon de microalgues sec est hydrolysé pendant 24 h par de l'acide chlorhydrique (HCl) à 5,5 M. Par la suite, les hydrolysats sont analysés après séparation par une chromatographie échangeuse de cations combinée à une post-colonne où ils vont réagir avec de la ninydrine (Hitachi 8900). Un complexe coloré est alors formé, absorbant à deux longueurs d'ondes (570 nm et 440 pour la proline et hydroxy-proline). Ce protocole permet de quantifier les acides aminés à l'exception des soufrés (cystéine, méthionine) et du tryptophane. Ce dernier est quantifié avec la même colonne après une hydrolyse alcaline avec du NaOH à 6M. Le facteur de conversion azote/protéines est calculé à partir du rapport de la teneur totale en protéines sur la teneur en azote du même échantillon. La teneur totale en azote a été quantifiée par analyse des composés organiques par SCA-CNRS (Solaize, France). L'échantillon est minéralisé puis

l'azote est quantifié par analyse infrarouge. Par ailleurs, l'azote total a également été déterminé par la méthode de Kjeldahl, à l'ADIV de Clermont-Ferrand.

3.2.1.2. Protéines hydrosolubles

Plusieurs méthodes de dosages de protéines hydrosolubles existent (Bradford, BCA, Lowry...). La méthode de Lowry détecte les protéines grâce à une réaction impliquant les ions cuivre. Ces derniers se lient aux atomes d'azote protéique dans un environnement alcalin. Dans un premier temps, les ions cuivre sont réduits. Dans un second temps, le complexe acides aminés (tryptophane, tyrosine cystéine) et ions cuivre formé réduit le complexe acide contenu dans le réactif de Folin. Cette réaction chimique donne une coloration bleue dont l'absorbance est mesurée à 750 nm. La méthode de Lowry a été retenue pour analyser les échantillons issus d'*H. pluvialis* car la longueur d'onde de lecture des résultats (750 nm) se situe en dehors de la zone d'absorbance des pigments. Avec les autres méthodes de dosage, la présence de ces pigments entraîne une surestimation des quantités de protéines.

L'échantillon est traité avec le réactif de Lowry qui est un réactif cuivrique alcalin, puis par le réactif de Folin. Ce dernier est une solution constituée de tungstate de sodium et de molybdate de sodium en solution dans de l'acide sulfurique et chlorhydrique (Folin & Ciocalteu's phenol reagent : Sigma-Aldrich). Le réactif de Lowry est préparé à partir d'un mélange de 3 solutions (A, B et C) dans le ratio 100 : 1 : 1 de A : B : C.

Solution A :

-NaOH 2,86 g

-Na₂CO₃ 14,31 g

-Eau ultra pure qsp 500 mL

Solution B :

-CuSO₄, 5H₂O 1,42 g

-Eau ultra pure qsp 100 mL

Solution C :

-Na₂ tartrate, 2H₂O 2,85 g

-Eau ultra pure qsp 100 mL

Le réactif de Folin est préparé juste avant utilisation en diluant 5 mL du réactif avec 6 mL d'eau ultra pure. La gamme d'étalon est réalisée avec une solution mère d'albumine de sérum bovin (ASB) à 0,1 g/L.

Cinq cent µL d'échantillon sont mélangés avec 700 µL du réactif de Lowry puis incubés 20 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. Par la suite, 100 µL du réactif de Folin sont rajoutés au milieu réactionnel avant de remettre les tubes à l'obscurité pour 30 minutes à température ambiante. L'absorbance est mesurée à 750 nm (spectrophotomètre UV-Vis CPS-240 A, Shimadzu).

3.2.2. Caractérisation des protéines

3.2.2.1. Chromatographie d'exclusion stérique (CES)

La distribution des poids moléculaire des protéines hydrosolubles a été évaluée par chromatographie d'exclusion stérique (CES). L'analyse a été réalisée à l'aide d'un chromatographe AKTA Purifier (Amersham Biosciences, UK) équipé d'un détecteur UV-vis. La colonne Superdex 200 10/300 GL (Amersham Biosciences, UK) est calibrée avec un mélange de protéines standards dont les poids moléculaires varient de 670 à 1,35 kDa (thyroglobuline bovine : 670 kDa, globuline bovine : 158 kDa, ovalbumine : 44 kDa, myoglobine 17 kDa, vitamine B : 1,35 kDa). La colonne Superdex peptides 10/300 GL (Amersham Biosciences, UK) est calibrée avec un mélange de peptides standards dont les poids moléculaires varient de 12,38 à 0,075 kDa (cytochrome c : 12,38 kDa ; aprotinin : 6,5 kDa ; glucagon : 3,8 kDa ; (Gly) 6 : 0,36 kDa ; Gly-Gly-Gly: 0,18 kDa ; GlyAla : 0,146 kDa ; glycine : 0,075 kDa).

Les échantillons sont pré-filtrés à 0,2 µm puis 0,1 mL sont injectés. L'élution se fait avec un tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7 avec un débit de 0,5 mL/min. Les protéines sont détectées en UV à 280 nm, l'absorbance est aussi lue à 660 nm et 480 nm pour les chlorophylles et les caroténoïdes respectivement.

3.2.2.2. Electrophorèse

L'électrophorèse permet de séparer les protéines en fonction de leur charge électrique, et pour des charges identiques, en fonction de leur taille. Dans le cas d'une électrophorèse dénaturante (SDS-PAGE), les protéines portent toutes une charge globale négative due à la présence de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS), un détergent anionique. En outre, la présence de β -mercaptoethanol réduit les ponts disulfures des protéines et sépare les sous-unités. Ainsi, l'électrophorèse SDS-PAGE permet de déterminer les poids moléculaires des sous-unités constitutives des protéines, en utilisant leurs différentes distances de migration sous l'influence du champ électrique. Le gel d'électrophorèse est constitué d'un mélange de acrylamide/bis-acrylamide, polymérisé par ajout d'agents de polymérisation (TEMED et persulfate d'ammonium). Les gels sont coulés verticalement dans un appareil mini-protean 3 (Biorad) avec une concentration en acrylamide/bis-acrylamide à 12 % en partie basse (gel de séparation) et 4 % en partie haute (gel de concentration). Les solutions de gels sont préparées à partir d'une solution commerciale à 30 % d'acrylamide/bis-acrylamide (37,5/1, p/p, Biorad), en les diluant dans du tampon Tris 1,5 M-SDS 0,2 % à pH 8,8 pour le gel à 12% et tampon Tris 0,5 M-SDS 0,1 % à pH 6,8 pour le gel à 4 %. Après polymérisation par l'APS et le TEMED, les gels sont placés dans la cuve de migration contenant du tampon Tris-SDS pH 8,3 constitué de 20 mM de Tris base, 192 mM de glycine, et 0,1 % de SDS.

Avant dépôt des échantillons (15-30 μ g de protéines par puit), ceux-ci sont dénaturés en mélangeant 100 μ L d'échantillon (dilué si besoin dans du tampon phosphate de sodium 10 mM à pH 8,3) avec 25 μ L d'une solution contenant 10 g de SDS, 2,5 mL de β -mercaptoéthanol, 25 g de glycérol (lest) ainsi que 0,5% de bleu de bromophénol, le tout dissous dans 50 mL de tampon Tris 0,2 M à pH 6,8. Le milieu réactionnel est porté à 95°C pendant 5 min. Un standard protéique contenant un mélange de protéines pré-marquées (Biorad) dont les masses moléculaires varient de 250 à 10 kDa a été utilisé pour l'étalonnage.

Les protéines dénaturées sont séparées sous l'influence d'un champ électrique de 150V, à 4°C pendant 2 heures. Puis les bandes protéiques sont révélées par coloration au bleu de Coomassie R250 (solution à 0,25 % de bleu de coomassie R250, 30 % méthanol, 10 % acide acétique, 60 % eau) pendant 1 h sous agitation suivie d'une décoloration (30 % méthanol, 10 % acide acétique, 60 % eau) pendant 3h sous agitation. Enfin, les gels sont scannés.

3.3. Lipides

3.3.1. Extraction et Quantification des lipides

3.3.1.1.Lipides totaux

La méthode de Bligh et Dyer (1959), modifiée au laboratoire, a été utilisée pour déterminer la teneur en lipides des biomasses d'*H. pluvialis*. Il s'agit d'une méthode d'extraction aux solvants (chloroforme, méthanol et eau), développée initialement pour l'extraction des phospholipides à partir de muscles de poissons ayant une teneur faible en lipides et une forte proportion d'eau. Dans le cas des microalgues qui possèdent généralement des teneurs en lipides supérieures à 10 %, la méthode originale de Bligh et Dyer entraîne souvent une sous-estimation de la teneur. La modification apportée consiste à augmenter le ratio solvants / échantillon et permet de récupérer davantage de lipides (rendement d'extraction supérieur à 95 %) contenus dans un échantillon donné.

Un mélange de chloroforme : méthanol est préparé dans les proportions 1 : 2 (v : v) et 3,75 mL de ce mélange sont ajoutés à 1 mL d'échantillon. Puis 1,25 mL de chloroforme pur sont rajoutés dans le milieu d'extraction suivi de l'ajout du même volume d'eau distillée. Entre chaque ajout de solvant, le milieu réactionnel est vortexé afin de favoriser l'extraction des lipides. Le mélange final est centrifugé à 2000 g pendant 10 minutes puis la phase organique inférieure est récupérée et transférée dans des tubes préalablement séchés et pesés à vide. La phase organique est évaporée dans un évaporateur centrifuge Speed-Vac (Savant™ SPD111 SpeedVac™, ThermoScientific) à 40°C sous un vide de 950 mbars, jusqu'à stabilisation de la masse des tubes. La teneur en lipides est ensuite quantifiée par gravimétrie.

3.3.1.2.Lipides neutres et polaires

Les lipides sont de nature biochimique variable, on distingue les lipides neutres (LN) des lipides polaires (LP). Les triacyl-glycérols (TAG) qui sont les matières premières à la production de biodiesel font partie des lipides neutres. L'extraction, la séparation et la quantification de ces différentes familles de lipides ont été réalisées par le laboratoire UMR CNRS 6144 GEPEA (Génie des Procédés Environnement et Agroalimentaire) de Saint-Nazaire. La Figure 21 illustre le procédé mis en œuvre afin de séparer les différentes formes de lipides. Le fractionnement a été réalisé suivant le principe d'extraction en phase solide (SPE pour Solid Phase Extraction) sur une colonne de silice de 7 cm, désactivée à 450°C et stabilisée avec 6 % en masse d'eau distillée. L'extrait lipidique sec est remis en solution dans 500 µL de chloroforme stabilisé à l'amylène et déposé en tête de la colonne. L'élution de la première classe de lipides, les TAG, est réalisée

avec 8 mL de chloroforme stabilisé à l'amylène. Puis, 8 mL d'un mélange chloroforme : méthanol (98 : 2, v : v) sont ajoutés et les autres lipides neutres (hors TAG) sont collectés. Enfin, les lipides polaires sont élués de la colonne par 16 mL de méthanol. Chaque fraction est conservée à -20°C en attendant son analyse par chromatographie gazeuse.

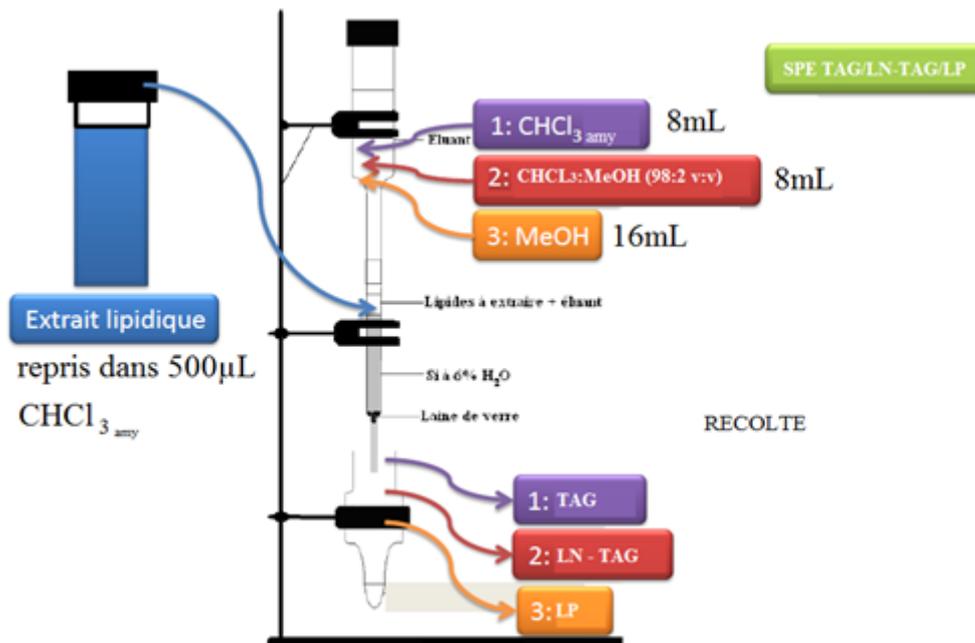


Figure 21 Fractionnement des lipides neutres et polaires

3.3.2. Caractérisation des acides gras

La chromatographie en phase gazeuse permet la séparation, l'identification ainsi que la quantification des différents acides gras. L'analyse des classes de lipides a été réalisée au laboratoire GEPEA de Saint-Nazaire à la suite du fractionnement, alors que les autres quantifications des acides gras présentées dans ce travail ont été réalisées à l'Institut Pascal (IP). Les deux méthodes utilisées reposent sur le principe de la synthèse d'esters méthyliques d'acides gras à l'aide de méthanol et en présence de Boron trifluoride comme catalyseur (méthode de Morrison et Smith, 1964) mais de petites différences existent au niveau des protocoles.

3.3.2.1. Estérification des acides gras

Protocole GEPEA :

Cent µL de l'échantillon à analyser sont évaporés sous flux d'azote après l'ajout de 10 µg de glycérol tri-heptadécanoate (TG 17:0) comme étalon interne et mis en réaction avec 1,2 mL de

Méthanol-BF₃ (14 % p/p) pendant 10 min à 100°C. Après refroidissement pendant 20 min à température ambiante, les échantillons méthylés, sont repris dans 1 mL d'hexane. Par la suite, la phase organique contenant les ester méthyliques d'acides gras (EMAG) est lavée 3 fois par 1,5 mL d'eau distillée saturée en hexane, dans le but d'éliminer le BF₃. Enfin, les EMAG sont récupérés et injectés en chromatographie en phase gazeuse.

Protocole IP :

Huit cent µL d'une solution de Méthanol-BF₃ à 14 % p/p (FLUKA) sont mis en contact avec 100 µL de chloroforme contenant les acides gras. Puis le mélange est porté à ébullition dans un bain-marie pendant 15 minutes et il est refroidi à température ambiante. 1,5 mL d'eau distillée sont rajoutés au milieu réactionnel ainsi que 750 µL d'hexane contenant 1 % (v/v) d'heptadécane comme étalon interne. Le mélange est vortexé pendant 2 minutes puis décanté. La phase supérieure qui contient les acides gras méthylés est récupérée et 1 µL de cet extrait est injecté dans la chromatographie en phase gazeuse.

3.3.2.2. Analyse par chromatographie en phase gazeuse (CG)

Le profil d'acide gras est obtenu par analyse avec une chromatographie en phase gazeuse (CG) équipée d'un détecteur à ionisation de flamme (DIF). Au GEPEA, l'appareil est de marque Thermo-Fisher Scientific. La colonne utilisée est une colonne polaire TR-WAX (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm; Thermo-Fisher Scientific). Le four est réglé à une température initiale de 45°C pendant 1,5 minutes qui augmente avec une rampe de 15°C/min jusqu'à 150°C, puis de 6°C/min jusqu'à 240°C. Enfin la température est maintenue à 240°C pendant 3 minutes. La température du détecteur est fixée 250°C et le split ratio réglé à 1 : 5. L'acquisition des données et leur traitement se fait par le logiciel ChromCard 2.4.1 (Thermo-Fisher). A l'IP, la chromatographie gazeuse est de type Agilent 6850 Series II, équipée d'un passeur automatique G4513A. Le volume d'échantillon injecté est de 1 µL. La colonne utilisée est une colonne polaire HP 88 (112-88A7E) de 100 m x 0,25 mm x 0,2 µm. Le four est réglé à une température initiale de 140°C pendant 5 minutes puis une augmentation de température est programmée avec une rampe de 4°C/min jusqu'à 240°C. Enfin la température est maintenue en palier à 240°C pendant 5 minutes. La durée totale d'une analyse est de 35 minutes durant lesquels l'injecteur et le DIF sont réglés 260°C, le split ratio est fixé à 1 : 20 et l'azote sert de gaz vecteur. L'acquisition des données et leur traitement se fait par le logiciel ChemStation.

Dans les 2 cas, les différents esters méthyliques d'acides gras sont identifiés grâce à la comparaison de leur temps de rétention avec ceux de standards étalons méthylés selon la même méthode et préalablement injectés (au GEPEA, 37 standards injectés ; à l'IP voir Tableau 8), et leur quantité est obtenue par comparaison de la surface de leur pics par rapport aux gammes étalons. La surface du pic d'étalon interne permet de corriger les variations de volumes injectés. À la fin de cette analyse, le pourcentage des différents acides gras est obtenu en rapportant cette quantification à la masse sèche initiale de l'échantillon.

Tableau 8 Liste des acides gras méthylés utilisés en standards de calibration à l'Institut Pascal et temps de rétention relevés pour cette méthode

	Temps de rétention (min)	Acides gras		
1	12,419	Acide	Undecanoïque	11:0
2	13,647	Acide	Laurique	12:0
3	15,476	Acide	Myristique	14:0
4	15,987	Acide	Myristoléique	14:1n-5
5	18,684	Acide	Palmitique	16:0
6	20,096	Acide	Palmitoléique	16:1n-7
7	21,075	Acide	hexadecatrienoïque	16:3n-3
8	22,368	Acide	Stéarique	18:0
9	23,039	Acide	Elaïdique	18:1n-9t
10	23,326	Acide	Oléique	18:1n-9c
11	23,730	Acide	Linolélaïdique	18:2n-6t
12	24,520	Acide	Linoléique	18:2n-6c
13	25,353	Acide	Arachidique	20:0
14	25,826	Acide	α -linoléinique	18:3n-3
15	27,958	Acide	γ -linoléinique	18:3n-6
16	29,106	Acide	Arachidonique	20:4n-6
17	29,412	Acide	ecosapentaenoïque	20:5n-3
18	29,987	Acide	Béhénique	22:0
19	30,388	Acide	Docosadienoïque	22:2n-6
20	32,487	Acide	Lignocérique	24:0

3.4. Pigments

3.4.1. Quantification des pigments

La teneur en pigments chlorophylliens et caroténoïdiens est calculée par dosage spectrophotométrique après extraction par un solvant. Pour les dosages réalisés sur la biomasse entière ou les culots de broyage (résidus solides), la méthode de Mendes et Pinto (2001) est

appliquée pour l'extraction. Trente mg de l'échantillon sec sont mis en contact avec 2 mL d'acétone pure. Le mélange est agité pendant 12 heures puis le milieu réactionnel est centrifugé à 20 000 g pendant 10 minutes. Dans certains cas, le dosage intervient après extraction de la fraction liposoluble comme indiqué au paragraphe 3.2.1.3. L'extrait est alors repris dans 500 µL d'acétone directement après l'étape d'évaporation, vortexé, et analysé. L'absorbance est lue à 470, 644,8 et 661,6 nm (spectrophotomètre Jasco V630, équipé du logiciel SpectraManager) dans des cuves en quartz. Ces longueurs d'onde sont spécifiques aux pigments extraits à l'acétone. Les concentrations en pigments (µg/mL) sont calculées selon les équations de Lichtenthaler et Buschmann (2001) suivantes (Équation 7):

$$\begin{aligned}Ca &= 11,24 * A_{661,6} - 2,04 * A_{644,8} \\ Cb &= 20,13 * A_{644,8} - 4,19 * A_{661,6} \\ C_{x+c} &= (1000 * A_{470} - 1,90 * Ca - 63,14 * Cb) / 214\end{aligned}$$

Équation 7 Calcul des concentrations en chlorophylle *a* (Ca), chlorophylle *b* (Cb), et caroténoïdes totaux (Cx+c)

3.4.2. Caractérisation des pigments

Les pigments chlorophylliens et caroténoïdiens d'*Haematococcus pluvialis* ont été séparés et identifiés par chromatographie liquide à haute pression (CLHP). Le profil des pigments de microalgues a été obtenu en utilisant une chromatographie liquide de type Agilent série 1100, équipée d'un module de pompes, d'un injecteur automatique et d'un détecteur à barrette de diodes. L'acquisition des données et leur traitement se fait par le logiciel ChemStation (version A.08.03).

Les pigments sont extraits selon la méthode décrite précédemment. Le surnageant acétonique est évaporé sous azote. Le culot contenant les pigments obtenus après séchage est repris dans un mélange de solvants contenant du dichlorométhane et du méthanol dans les proportions 25 : 75 (v : v) selon le protocole de Yuan et al. (1997). De l'astaxanthine libre (Glentham), de la lutéine (Glentham), de la chlorophylle *a* (Sigma-Aldrich), de la chlorophylle *b* (Sigma-Aldrich) et du β-carotène (Glentham) sont solubilisés dans le même mélange de dichlorométhane et de méthanol et sont utilisés comme standards.

Les échantillons, filtrés à travers des filtres de 0,45µm, sont séparés par une colonne C18 de 150 mm x 4,6 mm x 5 µm (Phenomenex) à 40°C. La phase mobile est constituée d'un mélange de solvants composé de méthanol (69 %), dichlorométhane (17 %), acétonitrile (11,5 %) et eau

(2,5 %). Le débit est fixé à 0,7 mL/min et 20 µL des échantillons sont injectés. L'acquisition est réalisée à 445 nm.

4. Lyse cellulaire

Afin d'accéder aux composés intracellulaires d'*Haematococcus pluvialis*, une étape de lyse cellulaire est nécessaire. Afin de déterminer les conditions les plus favorables pour l'extraction des composés, la lyse mécanique et/ou chimique a été testée sur les souches de *H. pluvialis* verte et rouge. Puis, les quantités de protéines, sucres, lipides et pigments extraites sont estimées pour chacune des conditions étudiées.

La lyse mécanique est réalisée avec un broyeur cellulaire à haute pression (HP) (TS HAIVA, Constant Systems LTD). Dans un premier temps une quantité donnée de pâte fraîche de microalgues est diluée dans de l'eau ultrapure afin d'obtenir une suspension de microalgues à 2 % (m/v) de matière sèche. La suspension est agitée pendant quelques minutes afin de disperser les microalgues. Puis pour chaque pression fixée, comprise entre 0,5 et 2,7 kbars (0,5/1/1,5/2/2,5/2,7 kbars), 200 mL de suspension sont broyés. Afin de vérifier que la hausse de pression a bien une influence sur l'extraction des composés de microalgues à pH natif, une suspension à 2 % de matière sèche et à pH natif non broyée a servi de référence. Dans un second temps, l'influence du nombre de passage à une pression donnée sur l'efficacité de l'extraction a été étudiée. Une suspension à 2 % de matière sèche à pH natif est broyée deux et trois fois à 2 kbars pour *H. pluvialis* vert et à 2,7 kbars pour *H. pluvialis* rouge.

La lyse chimique s'est appuyée sur une variation de pH modifié de natif (pH = 5) à neutre ou alcalin par l'ajout d'une solution de NaOH à 5 M. Enfin, l'influence de la lyse mécanique associée au pH neutre ou alcalin a été testée. La suspension est broyée à une pression et un nombre de passage fixés selon les résultats de l'influence de la lyse mécanique.

Les broyats obtenus après la lyse cellulaire sont centrifugés à 10 000 g pendant 30 min et à 20 °C. Les teneurs en lipides, pigments, protéines et sucres sont dosées à la fois dans les surnageants et les culots selon les méthodes présentées. La séparation et le fractionnement des molécules sont les étapes suivantes dans le schéma de bioraffinerie des *H. pluvialis* vert et rouge.

5. Concentration et séparation des composés d'intérêts

La séparation et le fractionnement des composés d'intérêts extraits est l'une des étapes cruciales de la démarche de bioraffinerie. Les différentes techniques et méthodes de séparation mises en œuvre ont pour objectif de diviser les composés en deux principaux groupes dans un premier temps : les hydrosolubles (protéines et sucres) et les liposolubles (lipides et pigments). Dans un second temps, le but était de fractionner ces groupes afin d'isoler chaque composé d'intérêt.

5.1. Procédé membranaire : Ultrafiltration

L'ultrafiltration est une technique de filtration membranaire qui sépare des molécules en fonction de leurs masses molaires et du seuil de coupure de la membrane utilisée, sous l'effet d'une différence de pression de part et d'autre de la membrane : la pression transmembranaire (PTM). La filtration s'opère en mode tangential, c'est-à-dire que le fluide circule parallèlement à la surface de la membrane comme l'illustre la Figure 22. Ce mode de filtration réduit l'accumulation des espèces à la surface de la membrane et évite par la même occasion le ralentissement du procédé. Le procédé permet d'obtenir 2 effluents finaux : le rétentat et le perméat.

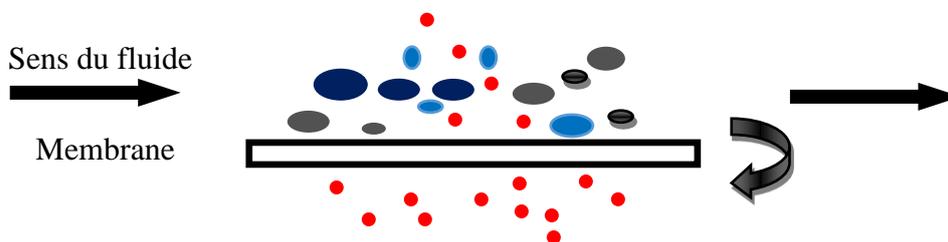


Figure 22 Principe de fonctionnement de l'ultrafiltration.

L'ultrafiltration permettrait de concentrer et éventuellement de fractionner les molécules hydrosolubles extraites et solubilisées dans les surnageants. Les essais d'ultrafiltration sont menés à l'échelle pilote sur une unité de filtration tangentielle Cogent M1 (Merck Millipore). Une membrane en cellulose régénérée avec un seuil de coupure de 1 kDa et une surface de filtration de 0,1 m² a été utilisée. Le schéma de principe de fonctionnement de l'installation et sa photo sont présentés sur la Figure 23.

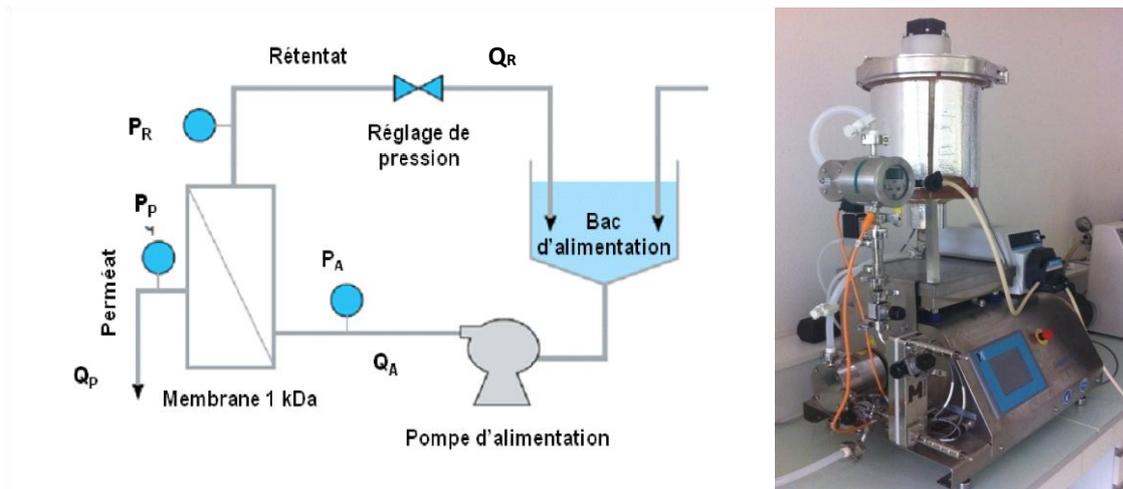


Figure 23 Schéma de principe et photo de l'unité de filtration Millipore Cogent M1.

Dans un premier temps, les paramètres opératoires optimaux sont recherchés. Il s'agit de paramètres liés à la membrane tels que la pression transmembranaire (PTM) et la densité du flux de perméat (J). Le flux de perméat (J) est calculé à partir du débit de perméat (Q_p) tandis que la pression transmembranaire est liée à la différence de pression de part et d'autre de la membrane. Ce paramètre est calculé selon l'Équation 8 ci-dessous :

$$J = Q_p / S$$

Équation 8 Calcul du flux de perméat

Avec J : flux de perméat en $kg/s/m^2$

Q_p : débit perméat en kg/s

S : surface membranaire en m^2

Pour ce faire, une différence de pression (ΔP) est fixée et on fait varier le PTM. Les débits de perméat correspondant sont mesurés et la densité du flux est calculée. A partir de ces données, la courbe de PTM en fonction du flux de perméat est tracée. Cette courbe permet de déterminer le J limite (J_{lim}), flux limite de perméat, pour lequel le débit de perméat est maximal et indépendant de la PTM. Ces informations permettent de fixer les conditions optimales d'ultrafiltration des surnageants de *H. pluvialis*, notamment le couple (ΔP , PTM).

Avant ultrafiltration, le surnageant est prétraité par une filtration sur verre fritté dont le diamètre de pore est compris entre 10 et 16 μm . A la suite de l'ultrafiltration des surnageants, les

composés sont dosés à la fois dans le perméat et le rétentat selon les méthodes décrites précédemment.

5.2. Précipitations

Dans cette partie, le but est de séparer une fraction spécifique de molécules, par exemple les protéines, de l'ensemble des autres composés (lipides, sucres et pigments) issus d'*Haematococcus pluvialis*. Les méthodes chimiques mises en œuvre sont basées sur l'affinité qu'ont certains composés avec des molécules tels que le polyéthylèneimine (PEI) et le sulfate d'ammonium (SAm), ou leur baisse de solubilité en fonction du pH.

5.2.1. Flocculation au polyéthylèneimine (PEI)

Le PEI utilisé est sous forme branché, et de haute masse molaire (M_w moyenne : 750 kDa). Il est disponible auprès de la société Sigma-Aldrich sous la forme d'une solution à 50 % en masse de PEI. Son utilisation comme agent de purification des protéines hydrosolubles a été testée sur le surnageant de broyage d'*H. pluvialis* rouge (SBr), récupéré après centrifugation du broyat.

Le SBr obtenu après broyage et centrifugation subit une première étape de pré-clarification, soit par simple dilution avec de l'eau (ce qui permet d'adapter le ratio échantillon/PEI), soit une dilution avec une solution de tétraborate de sodium (borax) à 100 mM. Le pH des solutions et du SBr est préalablement ajusté par ajout d'une solution de NaOH (ou de HCl dans le cas du borax) à 1 M jusqu'à la valeur voulue (pH = 6,3 ; 7,4; 8,5 ou 10).

Par la suite, la flocculation est réalisée en additionnant un volume de SBr pré-clarifié et un volume de PEI. Les solutions de PEI ont une concentration comprise entre 0 et 0,125 %. Elles sont préparées avec de l'eau pure ou avec une solution de NaCl dont la concentration peut atteindre 1 M. Après dilution du PEI, le pH est ajusté en utilisant une solution de HCl 1 M afin qu'il soit identique au pH des surnageants à flocculer. Les solutions SBr/PEI sont homogénéisées par deux retournements successifs du tube. Elles sont ensuite centrifugées à 2500 g pendant 30 minutes et à 20°C. Le surnageant et le culot de flocculation sont récupérés pour les analyses.

5.2.2. Précipitation au sulfate d'ammonium (SAm)

Le sulfate d'ammonium est un agent de fractionnement des protéines hydrosolubles. Il permet, à la concentration adéquate, une précipitation sélective des protéines contenues dans une matrice moléculaire complexe par effet « salting-out ». Des essais de séparation/purification des protéines ont été menés sur le surnageant de broyat d'*H. pluvialis* vert (SBv).

L'influence du pourcentage de saturation en SAM (25, 40, 70 et 90%) sur l'efficacité de la précipitation a été évaluée.

A un volume donné de surnageant on rajoute du sulfate d'ammonium à la concentration adéquate pour atteindre 25, 40, 70 et 90 % de sulfate d'ammonium dans le mélange. L'ajout de SAM se fait progressivement, sous agitation et à une température de 4°C. Ces conditions d'agitation et de refroidissement sont maintenues pendant 1h puis la suspension obtenue est centrifugée à 10 000 g pendant 30 min à 4°C. Le précipité obtenu est séparé du surnageant. Sur ce dernier, les teneurs en protéines et en sucres sont quantifiées selon les méthodes décrites précédemment. Le précipité sous forme de culot est repris dans de l'eau puis dialysé contre de l'eau pure afin de réduire la salinité. Cette étape de dessalage par dialyse est réalisée avec une cellule Amicon sous agitation. Une cellule Amicon est un dispositif d'ultrafiltration tangentielle adaptée aux petits volumes, qui permet dans notre cas de déssaler l'échantillon grâce à une membrane en polyéthersulfone (Millipore) possédant un seuil de coupure de 1 kDa. Ainsi, l'eau et les petites molécules (sels), traversent la membrane, alors que les grosses molécules (protéines, sucres) restent dans le rétentat où elles sont concentrées. Régulièrement, de l'eau est ajoutée au rétentat afin de revenir au volume initial et de poursuivre le dessalage. Celui-ci est stoppé lorsque la conductivité du filtrat est réduite à 2 $\mu\text{S}/\text{cm}$. La concentration est ramenée à 2 g/L de protéines par dilution.

5.2.3. Précipitation par variation de pH

Les protéines précipitent à leur point Isoélectrique (pI), point qui correspond à un pH auquel elles portent une charge globale neutre. La précipitation protéique est réalisée par ajout progressif d'acide sur le surnageant à pH basique. Le pH est abaissé de 12 à 7, puis à 6 ainsi de suite jusqu'au pH = 3. Les précipités obtenus à chaque pH sont séchés puis caractérisés du point de vue de leurs propriétés fonctionnelles. Les protéines non précipitées et les sucres sont dosés dans les surnageants de précipitation.

5.3. Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC)

Comme décrit dans la synthèse bibliographique, la chromatographie de partage centrifuge est une chromatographie liquide-liquide basée sur la différence de partage des solutés entre 2 phases liquides non miscibles.

Les essais de fractionnement par chromatographie de partage centrifuge ont été réalisés au laboratoire GEPEA de Saint-Nazaire. L'appareil utilisé est un appareil semi-préparatif Fast CPC (FCPC) commercialisé par la société Kromaton et équipé d'une colonne de 30 mL. La colonne est constituée de 13 disques en acier inoxydable dans lesquels sont gravés 64 cellules de partage d'une capacité de 31 μL chacune, et reliées par des capillaires. Les différentes phases liquides ainsi que l'échantillon ont été introduits via une pompe de type piston. La détection en ligne est réalisée à l'aide d'un détecteur DEDL (détecteur évaporatif à détection de lumière) SEDEX 85 (SEDERE). Ce type de détecteur fonctionne en trois étapes : nébulisation, évaporation puis détection. Brièvement, l'éluant de la colonne est mélangé à un gaz inerte et passe par l'orifice étroit d'un nébuliseur pour produire une brume homogène. Cette brume fine se compose de gouttelettes de phase mobile contenant le composé d'intérêt. L'éluant nébulisé est entraîné dans un tube de chauffage où il est évaporé à basse température, permettant d'obtenir des molécules isolées. Le jet des particules solides entre dans une cellule qui inclut une source lumineuse (laser ou LED) et un photomultiplicateur. Les particules éclairées dévient la lumière en fonction de leur taille et la lumière déviée est détectée par le photomultiplicateur fixé à un angle défini de la lumière incidente (habituellement 45°). Le détecteur DEDL étant destructif il est nécessaire de diviser l'effluent en sortie de CPC afin de collecter les fractions en parallèle de la détection. Pour cela un split a été introduit en utilisant une vanne de division de flux. Le split a été programmé de telle sorte qu'environ 0,5 mL du flux sortant de la CPC soient transférés vers le système de détection. La majeure partie du flux est collectée manuellement dans des flacons en verre de 8 mL préalablement séchés et tarés. Le schéma et la photo de l'installation sont présentés en Figure 24 et Figure 25.

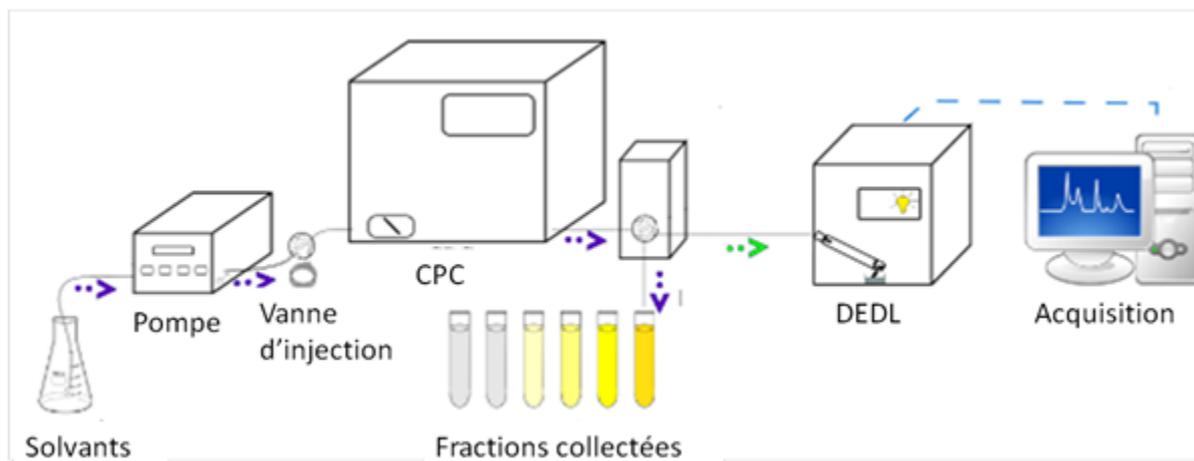


Figure 24 Représentation schématique du système d'extraction par CPC utilisé. Les flèches bleues représentent le circuit principal alors que les vertes représentent le circuit auxiliaire. D'après Chaabani 2014.



Figure 25 Photo de l'installation de CPC utilisée au laboratoire GEPEA de Saint-Nazaire

L'extraction se déroule en 3 étapes :

- Equilibre hydrodynamique

La colonne CPC est remplie par la phase stationnaire à une faible vitesse de rotation (500 rpm) et à un débit de 10 mL/min. Après remplissage de la colonne, la phase mobile est pompée en mode descendant. La vitesse de rotation de la colonne est amenée progressivement à la vitesse de travail de 1800 rpm ou 2100 rpm. Le débit de la phase mobile est ajusté à 3 mL/min. Cette dernière va déplacer un certain volume de phase stationnaire dans chaque cellule de partage qui

dépend du système de solvants, de la rotation, du débit, jusqu'à l'atteinte d'un équilibre hydrodynamique, détecté par la sortie de phase mobile. On détermine le volume de phase stationnaire déplacé à l'aide d'une éprouvette graduée et la rétention de phase stationnaire est calculée.

- Extraction

L'échantillon est injecté par l'intermédiaire d'une vanne d'injection sur laquelle est montée une boucle d'injection. L'échantillon est ensuite pompé, toujours en mode descendant. L'élution est lancée en faisant passer la phase mobile à un débit de 3 mL/min. L'acquisition (DEDL : Gain = 1 ; T°C = 38°C ; Pression = 3,5bar) est démarrée et des fractions d'environ 3 mL sont collectées. Chaque tube est ensuite pesé pour déterminer le volume exact collecté et stocké à -20°C avant d'être analysé pour son contenu en lipides et pigments.

- Extrusion ou Dual mode

Une fois l'extraction finie, le solvant constituant la phase stationnaire est à nouveau pompé afin de « pousser » la phase stationnaire présente dans la colonne et de la récupérer dans une éprouvette avec l'ensemble des composés qui y étaient retenus (extrusion). Dans la dernière expérience réalisée, à la place de l'extrusion, le mode de pompage a été inversé (passage en mode ascendant). La phase stationnaire devient alors la phase mobile, et inversement : on parle alors de mode double ou Dual mode. Cette méthode permet de fractionner les composés retenus dans la phase stationnaire initiale. Le débit sortant est collecté dans des tubes en verre comme précédemment.

Les essais de séparation lipides-pigments par CPC ont été réalisés sur un extrait issu du culot de broyage d'HPR. Cette forme d'*H. pluvialis* a été choisie parce qu'il contient plus de caroténoïdes (dont l'astaxanthine) et de lipides que la souche verte. L'extrait lipidique analysé est obtenu après l'extraction du culot de *H. pluvialis* rouge selon la méthode de Bligh et Dyer détaillée au paragraphe 3.2.1.3. Le culot humide (~100 g) est mis en contact avec le mélange chloroforme : méthanol puis la phase chloroformique est récoltée et séchée sous vide. Néanmoins, la concentration de la fraction liposoluble étant très importante, il n'a pas été possible d'évaporer la totalité du chloroforme mais seulement de le réduire au 1/10^{ème} (10 mL). Quarante mL d'acétone sont alors ajoutés, volume nécessaire à l'obtention d'un échantillon homogène. Dans les premiers essais (800 µL d'échantillon injecté), l'extrait est dilué au 1/10^{ème}

dans la phase mobile (selon les cas, acétonitrile ou méthanol). Dans le dernier essai (2 mL d'échantillon injecté), l'extrait a été préparé dans les mêmes conditions mais dilué seulement au 1/4^{ème} dans la phase mobile (méthanol). La proportion d'acétone injectée dans la colonne est donc plus importante dans le dernier essai.

Afin de choisir le système biphasique le plus adapté, plusieurs mélanges de solvants ont été testés (Tableau 9). Cinquante microlitres de l'extrait lipidique repris dans de l'acétone sont rajoutés dans chaque tube contenant 5 mL de volume total de solvant. Le coefficient de partage (ou coefficient de distribution, K_D) qui correspond au ratio de la concentration du soluté d'intérêt, ici les pigments, dans la phase mobile sur sa concentration dans la phase stationnaire est calculé.

Tableau 9 Systèmes bi-phasiques potentiels pour la CPC.

Solvant	Heptane (µL)	Acétone*(µL)	Méthanol (µL)	Acétonitrile (µL)
1	2820	0	2180	0
2	2820	220	1910	0
3	2580	490	1630	0
4	2580	0	0	2420
5	2580	220	0	2150
6	2580	490	0	1880
7	2570	760	0	1610

*+50µL de l'extrait lipidique dans de l'acétone

A partir des tests des systèmes bi-phasiques, 3 ont été retenus pour les essais (Heptane : Acétonitrile, Heptane : Acétonitrile (+ 2 % eau), et Heptane : Méthanol (+ 2 % eau)). En effet, l'ajout de 2 % d'eau permet de modifier légèrement la polarité du solvant et donc les coefficients de partage des solutés entre les 2 phases. Le Tableau 10 résume les conditions opératoires des différents essais.

Tableau 10 Paramètres opératoires utilisés lors des essais de fractionnement par CPC

Système de solvants	Heptane : Acétonitrile	Heptane : Acétonitrile (+ 2 % eau)	Heptane : Méthanol (+ 2 % eau)	Heptane : Méthanol (+ 2 % eau)
Concentration de l'injection (mg/mL)	38	3,8	3,8	39,5
Volume injecté (mL)	0,2	0,8	0,8	2
Mode	descendant + extrusion	descendant + extrusion	descendant + extrusion	dual mode (descendant puis ascendant)
Vitesse de rotation (rpm)	1800	1800	2100	2100
Débit d'élution (mL/min)	3	3	3	3
Pression (bars)	20-25	25	30-25	38
Rétention de la phase stationnaire (%)	73	75	64	72

Les fractions collectées sont analysées au spectrophotomètre pour déterminer leur contenu en chlorophylles et caroténoïdes totaux, selon la méthode décrite au paragraphe 3.3.1. Les pigments sont également identifiés par CLHP selon la méthode décrite au paragraphe 3.3.2. Enfin, les lipides sont analysés en chromatographie en phase gazeuse selon la méthode décrite au paragraphe 3.2.2.

6. Evaluation des propriétés techno-fonctionnelles

Les propriétés techno-fonctionnelles des composés issus de microalgues suscitent de plus en plus d'intérêts. Ils peuvent avoir d'éventuelles applications pour plusieurs domaines notamment dans l'alimentaire et la cosmétique. Les méthodes d'évaluation des protéines de *H. pluvialis* sont présentées dans cette partie.

6.1. Capacité Emulsifiante

La Capacité Emulsifiante (CE) des solutions protéiques a été évaluée par une méthode dérivée de celle de Thakur et al. (2008). De l'huile de tournesol est ajoutée continuellement à une solution protéique à 0,1 % (p/v) tandis que celle-ci est mécaniquement agitée à l'aide d'un homogénéisateur Ultraturax (T25, Ika-Werke GmbH, Germany). La conductivité du milieu est suivie à l'aide d'un conductimètre CDM210 (Radiometer Analytical, France) jusqu'à la déstabilisation de l'émulsion qui se traduit par une chute brutale de la conductivité. La capacité

émulsifiante correspond au volume maximal d'huile émulsionnée par gramme de protéines contenue dans la solution et s'exprime en mL d'huile/g de protéines.

6.2. Index d'Activité Emulsifiante

L'index d'Activité Emulsifiante (IAE) a été mesuré selon la méthode de Pearse et Kinsella (1978). A 20 mL d'une solution protéique à 0,1 % massique et à pH = 7 on rajoute 6,6 mL d'huile. Le mélange est maintenu sous agitation à l'Ultraturax pendant une minute. Immédiatement après, 50 µL de l'émulsion sont dilués dans 5 mL de sodium dodecyl sulfate à 0,1 %. L'absorbance (A_0) de cette solution est lue à 500 nm. L'IAE est calculé selon l'Équation 9, en intégrant les paramètres tels que la fraction volumique d'huile ($\varphi = 0,25$), les caractéristiques de la chambre d'absorption de la cuve spectrophotométrique (longueur $L = 1$ cm), la concentration protéique ($C = 1$ g/L) ainsi que le facteur de dilution ($d=100$).

$$IAE \left(\frac{m^2}{g} \right) = \frac{2,303 * A_0}{L} * \frac{2 * d}{10^6 * C * \varphi}$$

Équation 9 Calcul de l'index d'activité émulsifiante

Avec φ , la fraction volumique d'huile,
 L , la longueur de la cuve du spectrophotomètre,
 C , la concentration protéique (en g/L),
 d , le facteur de dilution.

6.3. Stabilité de l'émulsion (SE)

En plus de la CE et de l'IAE, la stabilité des émulsions de protéines microalgales a été évaluée grâce à la méthode de Yasumatsu et al. (1972). Une solution protéique est mélangée à un volume égal d'huile de tournesol. L'ensemble est homogénéisé à l'ultraturax puis un aliquot est prélevé et chauffé à 80°C pendant 30 min. L'échantillon est refroidi sous l'eau du robinet puis maintenu à température ambiante pendant 24 h. La stabilité est calculée par le ratio de la hauteur d'émulsion restante après 24 h sur la hauteur initiale.

III. Résultats et discussion

La souche de microalgue *Haematococcus pluvialis* a fait l'objet de ce travail de thèse. La sélection de la souche inclut une étape de "screening" qui reste consommateur en temps au vu de l'existence d'un grand nombre de microalgues. C'est la raison pour laquelle le choix est le plus souvent orienté vers une souche connue et déjà étudiée. Cependant, il serait moins intéressant ni innovant de travailler sur la bioraffinerie de « souches usuelles » telles que *Chlorella*, *Nannochlorosis* ou *Porphyridium*. Ces microalgues bien qu'intéressantes sont déjà largement documentées. La préférence est donc allée à *Haematococcus pluvialis*, une microalgue qui par sa taxonomie, sa biologie et sa composition présentée dans la synthèse bibliographique s'avère être un candidat pertinent à la bioraffinerie. Par ailleurs, la bioraffinerie d'*Haematococcus pluvialis* présente au moins un verrou technologique à lever, puisque son pigment d'intérêt, l'astaxanthine, est liposoluble. Cela nécessite donc de trouver un procédé permettant sa séparation des lipides, destinés à la production de biodiesel.

Dans ce chapitre sont présentés les principaux résultats obtenus au cours de cette thèse, sous la forme de 4 grandes parties. La première concerne la caractérisation de la biomasse et la mise au point des conditions de lyse cellulaire, La deuxième partie porte sur l'étude des propriétés techno-fonctionnelles des protéines d'*Haematococcus pluvialis* et sur leur potentielle valorisation en tant qu'agent émulsifiant. Les deux dernières parties sont consacrées aux procédés de fractionnement pouvant être mis en œuvre. Tout d'abord, la floculation au polyéthylèneimine (PEI), permettant la séparation des fractions liposolubles et hydrosolubles, puis le fractionnement des lipides et des pigments réalisé par chromatographie de partage centrifuge.

Partie 1 Composition générale et influence du broyage à haute pression

Comme présenté dans la synthèse bibliographique, *H. pluvialis* est une microalgue verte, mais qui sous certaines conditions de culture, accumule de l'astaxanthine ce qui lui donne une couleur rouge. L'objectif des travaux présentés dans cette partie est de déterminer la composition de la biomasse sèche des formes d'*H. pluvialis* rouge (HPR) et verte (HPV) des lots de biomasse reçus et l'influence des techniques d'extraction sur leur rendement. La connaissance de la composition de la biomasse est importante puisqu'elle permet d'une part d'évaluer l'efficacité des procédés qui seront mis en place par la suite. La caractérisation biochimique des molécules permet quant à elle de choisir les procédés les plus pertinents.

La composition élémentaire ainsi que la quantification et la caractérisation des différentes familles de molécules a donc été réalisée à partir de la biomasse globale. Une étude de l'influence des conditions d'extraction à haute pression sur le rendement d'extraction des composés intracellulaires a également été menée.

1. Composition générale de *H. pluvialis*

La composition élémentaire de HPV et HPR en pourcentage de matière sèche (MS) de la biomasse est présentée dans le Tableau 11.

Tableau 11 Composition élémentaire d'*H. pluvialis* vert (HPV) et rouge (HPR)

Minéraux	<i>H. pluvialis</i>	<i>H. pluvialis</i>
	Vert	Rouge
C	53,09 %	52,29 %
H	7,31 %	7,49 %
O	26,77 %	33,78 %
N	7,64 %	4,52 %
K	0,12 %	0,37 %
S	0,71 %	0,41 %
P	0,89 %	1,13 %
Mg	0,3 %	0,22 %
Na	200 ppm	110 ppm

L'analyse montre que les minéraux majoritaires sont le carbone, l'hydrogène, l'oxygène ainsi que l'azote. Le pourcentage de ces quatre atomes est plus important que ceux des autres éléments minéraux. Cela est probablement dû au fait qu'ils sont les briques de l'ensemble des molécules présentes chez *H. pluvialis*. Le pourcentage d'azote permet d'estimer la teneur en protéines chez cette microalgue (Lourenço *et al.*, 2002). Le phosphore est connu pour intervenir dans beaucoup de réactions métaboliques (Chen *et al.*, 2011). Il est l'un des constituant de l'ATP, des acides nucléiques et il intervient dans la composition des phospholipides et des phosphoprotéines (Soetan *et al.*, 2010; Hays et Swenson, 1985; Malhotra, 1998; Murray *et al.*, 2000). Il partage cette propriété avec le potassium qui joue aussi un rôle dans le métabolisme des sucres et des protéines. Le sodium intervient dans l'équilibre de la pression osmotique. Quant au magnésium, c'est un métal essentiel pour la croissance des algues, puisqu'il joue un rôle important dans la photosynthèse (Encarnaçao *et al.*, 2012). Le magnésium est en effet un élément central de la molécule de chlorophylle. Les travaux de recherche de Gorain *et al.* (2013) ont montré que des carences en magnésium et calcium induisent une diminution du rendement de la production de biomasse et une hausse de la teneur des lipides chez *Chlorella vulgaris* et *Scenedesmus obliquus*. Enfin, le soufre est présent dans les protéines en tant que composant des acides aminés tels que la cystéine et la méthionine. Il rentre par ailleurs dans la composition des vitamines (thiamine, biotine).

Si l'on compare la composition des deux biomasses, les différences apparaissent minimales. HPR présente un taux légèrement plus faible que HPV en azote et en soufre, mais plus élevé en oxygène, potassium et phosphore. Ces différences de composition sont probablement liées aux conditions de production des deux types de biomasses, puisque HPV est une biomasse « jeune », alors que pour HPR, les conditions de culture ont été modifiées afin d'induire l'accumulation d'astaxanthine. Parmi les « stress » décrits pour stimuler l'accumulation de d'astaxanthine chez *H. pluvialis*, on trouve l'augmentation de l'intensité lumineuse et les conditions de carence en azote (Zhekisheva *et al.*, 2002). Ce second mode d'induction pourrait expliquer le taux plus faible d'azote retrouvé dans la biomasse d'HPR. Néanmoins, il est difficile d'interpréter davantage ces différences, la biomasse ayant été fournie par la société Microphyt qui ne souhaite pas communiquer sur sa mode de production.

Suite à l'établissement de cette composition élémentaire, les grandes familles de molécules (sucres, protéines, lipides et pigments) ont été quantifiées et caractérisées.

2. Sucres

L'hydrolyse acide permet d'estimer la teneur totale en sucres toutes familles confondues. La biomasse sèche de HPV est composée de 30% de sucres. Par la suite, différentes méthodes de dosages ont été mises en œuvre pour les caractériser. Ainsi, l'amidon représente 7,5 % de la MS, soit 23 % des sucres de HPV. Les autres sucres d'*Haematococcus pluvialis* verte sont principalement des polysaccharides pariétaux. Ces polysaccharides, de type matriciels et fibrillaires, ont été quantifiés grâce à la méthode de Ramus (1972). Les résultats indiquent que les polysaccharides matriciels composent 7 % de la biomasse de HPV tandis que les polysaccharides fibrillaires en représentent 6 % (soit respectivement 23 et 20 % des sucres chez HPV). La composition en monosaccharides obtenue par HPAEC-PAD, révèle qu'il s'agit uniquement de sucres neutres, avec la présence majoritaire de glucose, dont la teneur s'élève à 64 g sur 100 g des monomères identifiés. On retrouve également du mannose (24 %) ainsi que du galactose (8 %), de l'arabinose (2 %) et de la glucosamine (1 %).

La biomasse de HPR contient 50 % de sucres, avec les pourcentages de polysaccharides pariétaux et de réserve en hausse par rapport à HPV. L'amidon atteint ainsi 14 % de la matière sèche chez HPR (soit 28 % des sucres de HPR), les polysaccharides fibrillaires sont à 16 % et les matriciels à 6 % (soit respectivement 32 et 12 % des sucres chez HPR), ce qui traduit une augmentation importante du taux de polysaccharides fibrillaires. La composition en monosaccharides est assez proche de celle de HPV. Le glucose représente 68 % des monosaccharides totaux, le mannose atteint 27 % et le galactose 3,3 %. Ces résultats traduisent donc une légère augmentation de la proportion de glucose et mannose.

Un dosage de sulfates a été réalisé sur les polysaccharides extraits des deux biomasses. Les polysaccharides sulfatés (porteurs de groupements SO_3^-) présentent un grand intérêt car ils sont décrits pour avoir des activités biologiques telles que anti-inflammatoires (Matsui *et al.*, 2003; Guzman *et al.*, 2003), antiviraux (Huheihel *et al.*, 2002), antioxydants (Chen *et al.*, 2010 ; Tannin-Spitz *et al.*, 2005) antitumoraux (De Jesus Raposo *et al.*, 2013) ou antiparasitaires (Roussel *et al.*, 2015). Malheureusement, les polysaccharides d'*H. pluvialis* sont sulfatés à moins de 1%.

Lorentz (1999) propose une teneur en sucres de 36,9 à 40 % pour *H. pluvialis*. Néanmoins, son étude ne précise pas le stade de croissance de la biomasse analysée. Par ailleurs, Boussiba et Vonshak (1991) ont évalué ce taux à 63 % de la MS chez une biomasse enkystée d'*H. pluvialis*. Nos valeurs, de 30 % chez HPV, et 50 % chez HPR ne semblent donc pas aberrantes. La hausse

de la teneur en sucres de HPV à HPR peut être une conséquence de la méthode de culture. Chez certaines microalgues lorsqu'une carence en azote est utilisée pour stimuler la production de caroténoïdes, elle favorise l'accumulation de glucides (Simas-Rodrigues *et al.*, 2015). Le fait que le glucose soit l'hexose majoritaire des monosaccharides de HPV est probablement lié à la présence d'amidon en tant que polysaccharide de réserve. Cependant pour HPR, en plus de l'amidon, le taux de polysaccharides fibrillaires est également plus important. Ceci est en accord avec les études menées sur l'ultrastructure de la paroi cellulaire chez *Haematococcus*, qui montrent que lors des premiers stades de l'enkystement, une paroi primaire est synthétisée, principalement constituée de cellulose, un autre polymère de glucose (Hagen *et al.*, 2002). Dans les stades plus avancés de l'enkystement (aplanospore), une gaine multicouche puis une paroi secondaire sont formées. L'étude de Hagen *et al.*, (2002) a montré que cette gaine était principalement constituée d'un polysaccharide de type mannane, ce qui explique l'augmentation du taux de mannose détecté chez HPR.

3. Protéines

La teneur en protéines totales est calculée par le produit entre le facteur de conversion azote-protéine (FAP) et le pourcentage d'azote. C'est une méthode répandue qui quantifie les protéines totales. L'avantage de cette méthode de calcul est qu'elle ne nécessite pas d'extraction préalable et prend en compte à la fois les protéines solubles et insolubles. Safi *et al.*, (2012) ont démontré l'importance du type de membrane de la microalgue sur le FAP. Etant donné que la physiologie de la cellule dépend de son mode de culture, on peut supposer qu'il y a autant de facteurs de conversion que de microalgues et de modes de culture. Donc le FAP d'une souche de microalgues ne peut être utilisé pour une autre.

L'alternative est de déterminer la composition primaire des protéines de *H. pluvialis*. A partir de cette information, il est possible de calculer leur teneur totale et le FAP spécifique à nos souches. Le profil en acides aminés (AA) de la biomasse de *H. pluvialis* est présenté dans le Tableau 12. Les acides aminés sont exprimés en pourcentage de MS de la biomasse.

D'après les valeurs obtenues avec l'aminogramme, les protéines constituent 27 % de la matière sèche de la biomasse de HPV. Sachant que le pourcentage en azote de cette même souche, déterminé par analyse Kjeldahl, est de 7,64 %, le facteur de conversion de HPV est de 3,4. En comparaison aux données reportées dans la littérature (Ju *et al.*, 2012; Safi *et al.*, 2012), ce facteur est nettement plus faible (3,4 versus 6,25). Ce contraste peut être attribué à la différence qui existe entre les conditions et les milieux de cultures. Ces derniers déterminent la

composition moléculaire d'une microalgue et par la même occasion leur profil en acides aminés.

Tableau 12 Teneur en acides aminés de la biomasse de *H. pluvialis* verte, comparaison avec les teneurs proposées par Lorentz (1999) et quelques exemples des teneurs références en acides aminés selon la FAO (Food and Agricultural Organization)

Acides aminés	g AA / 100g MS HPV	g AA / 100g MS (Lorentz 1999)	mg AA / g protéines HPV	mg AA / g protéines (FAO)
ASP	2,4	1,7-2,31	90	-
THR*	1,9	0,78-1,24	70 / 2,1 ^a	34
SER	1,3	0,73-1,06	50	-
GLU	3,4	1,70-2,39	130	-
GLY	1,4	0,84-1,32	50	-
ALA	2,1	1,30-1,92	80	-
VAL*	1,5	0,83-1,94	60 / 1,7 ^a	35
ILEU*	1,1	0,55-0,97	40 / 1,4 ^a	28
LEU*	2,6	1,21-1,84	100 / 1,5 ^a	66
TYR	1,0	0,40-0,63	40	-
PHE*	1,5	0,61-1,05	60 / 0,95 ^a	63
HIS	0,6	0,48-0,76	20	-
LYS*	1,4	0,75-1,32	60 / 1 ^a	58
ARG	2,1	0,81-1,34	80	-
PRO	1,5	0,69-1	60	-

*acide aminés essentiels ; ^a IAAE : index des acides aminés essentiels

A l'instar de la verte, le FAP de la souche rouge est très peu documentée. Cependant Safi et al. (2012) l'estiment à 6,25 pour la biomasse totale de HPR. N'ayant pas pu obtenir l'aminogramme de HPR dans le cadre de notre étude, la problématique est de savoir si le facteur à utiliser est le 6,25 de la bibliographie ou le 3,4 de HPV. Dans le cas où le facteur serait de 6,25 et en prenant en compte le pourcentage d'azote qui est de 4,52, nous arrivons à une teneur en protéines de 28,25 % pour HPR. Cependant la synthèse des pigments caroténoïdiens responsables de la couleur rouge de HPR s'apparie à une baisse de la teneur en protéines (Kobayashi *et al.*, 1997), il serait donc plus pertinent d'utiliser le facteur de HPV. Avec ce dernier, la teneur est quasiment la moitié de celle calculée précédemment (15 %) et plus faible

que celle de HPV (27 %). Ces 2 valeurs semblent en accord avec celles (entre 17 et 37 %) reportées par Lorenz (1999).

Le profil d'acides aminés montre que l'acide glutamique est le plus présent chez HPV (3,4%) ce qui est courant chez les microalgues (Brown, 1991). Viennent ensuite la leucine, l'acide aspartique, l'alanine, et l'arginine à des teneurs supérieures à 2%. Ces résultats sont globalement en accord avec les résultats de Lorentz (1999) pour lesquels ces AA sont également parmi les AA majoritaires. Cependant, l'ordre n'est pas tout à fait le même puisque notre biomasse est plus riche en leucine (2,6% contre 1,21-1,84 %). A l'inverse, dans son étude la valine est le 3^{ème} AA le plus représenté (0,83-1,94 %) alors qu'il est seulement à la 7^{ème} place dans notre étude (1,5 %). Par ailleurs, les protéines de *H. pluvialis* contiennent très peu d'histidine (0,6 %, et 0,48-0,76 % d'après Lorentz 1999). Les AA essentiels représentent environ 40% de la totalité des AA. L'acide aminé essentiel dominant est la leucine tandis que l'AA limitant est l'isoleucine.

Le profil d'AA nous renseigne aussi sur la qualité nutritionnelle des protéines de *H. pluvialis*. Afin d'évaluer l'intérêt de ces protéines, un score est calculé à partir des teneurs en acides aminés essentiels. Ce score appelé « Index d'acide aminé essentiel » (IAAE) est le ratio de la teneur en AA essentiel d'une source potentielle de protéines sur la teneur en AA d'un aliment référence fournie par la FAO (FAO, 1991 ; Tabarsa *et al.*, 2012). Lorsque le score d'IAAE est $\geq 0,95$, la protéine étudiée est dite de « haute qualité ». Un IAAE compris entre 0,86 et 0,95 correspond à une protéine de « bonne qualité ». La protéine « utile » a un score entre 0,75 et 0,86 et enfin elle est « inadéquate » quand l'IAAE ne dépasse pas 0,75 (Zhang *et al.*, 2008). Tous les acides aminés essentiels de HPV ont un score supérieur à 0,95. Ainsi selon les standards de la FAO, les protéines de cette microalgue sont de haute qualité du point de vue nutritionnel et sont de bons candidats si elles sont destinées à l'alimentation humaine.

Les autres composés de la biomasse d'*H. pluvialis* (lipides et pigments) ne pouvant être quantifiés sans lyse cellulaire préalable, une méthode de lyse a dû être sélectionnée. Comme décrit dans la partie Synthèse bibliographique (paragraphe 4.1), plusieurs méthodes de lyse physiques ou chimiques existent. Compte-tenu du matériel disponible au laboratoire, notre choix s'est porté sur une méthode physique : le broyage haute pression. Une étude de l'influence de la pression appliquée et du nombre de passage dans un broyeur haute pression a donc été conduite afin d'optimiser l'extraction.

4. Influence de la pression et du nombre de passage sur les lipides et les pigments : Quantification et caractérisation

La lyse cellulaire est une étape cruciale pour la libération des composés intracellulaires, tels que les composés liposolubles. Par la suite une étape d'extraction au solvant permet de les isoler facilement et de les quantifier par gravimétrie ou au spectrophotomètre pour les pigments selon les méthodes décrites dans la section Matériels et Méthodes (paragraphe 3.2.1.3 et 3.3.1). Cependant le broyage cellulaire est aussi le moyen d'extraire les autres composés hydrosolubles (protéines et sucres) afin de les fractionner et étudier leur potentielle valorisation. Les paramètres optimaux de broyage ont donc été étudiés, le but final étant de maximiser les rendements d'extraction et de standardiser cette étape pour la suite des travaux. Plusieurs paramètres peuvent influencer le rendement d'extraction : la pression de broyage et le nombre de cycle de broyage à une pression donnée appelée nombre de passage. Les contraintes sont de minimiser la pression de travail et le nombre de passage afin de limiter la consommation énergétique, et par extension les coûts.

Les conditions de broyage sont appliquées sur une suspension de microalgues à 2% de MS. Cette concentration a été choisie suite à différents travaux conduits au laboratoire sur *Chlorella vulgaris* et *Porphyridium cruentum*. Les pigments et les lipides sont extraits du broyat total obtenu en fin de lyse cellulaire (phase aqueuse + débris cellulaires). La Figure 26 présente le rendement d'extraction des lipides (g lipides / 100 g MS biomasse) de HPV en fonction de la pression de broyage. Le rendement d'extraction passe de 5 à 10 % lorsque la pression passe de 0,5 à son maximum de 2,7 kbars. Au-delà de 2 kbars, le rendement d'extraction n'est plus significativement influencé par la pression. Le moyen d'améliorer le rendement serait de multiplier le nombre de passage à la pression où le rendement est le plus élevé notamment 2 kbars. Cependant avant de tester l'influence du nombre de passage, nous avons étudié le rendement d'extraction des autres fractions moléculaires en fonction de la pression. Il s'avère que les protéines et les sucres hydrosolubles, quantifiées par dosages colorimétriques, suivent la même tendance que les lipides. Des protéines totales initiales, 9 ± 1 % à 15 ± 1 % sont solubilisés dans le surnageant lorsque la pression passe de 0,5 et 2 kbars. En ce qui concerne les sucres, la hausse de pression de 0,5 à 2 kbars permet d'en solubiliser + 7 %. Les rendements d'extraction de ces deux composés stagnent au-delà de 2 kbars. La hausse de la pression au-delà de cette valeur n'a pas d'impact significatif sur l'extraction et la solubilisation de ces molécules. Afin d'extraire le maximum de composés possibles, le nombre de passage à 2 kbars a été augmenté. Le mélange obtenu au passage 1 est broyé 2 fois de suite. Les rendements de

tous les composés se sont améliorés à 2x2 kbars excepté ceux des pigments. Le rendement en caroténoïdes s'est stabilisé à 1% et pour les chlorophylles *a* et *b* à 2 % de la MS du broyat de HPV. Pour les sucres hydrosolubles extraits, le rendement est passé de 16 à 22 %, les protéines de 15 à 17 % et les lipides ont eu une hausse de + 2 %. Lors du troisième passage à 2 kbars, la hausse des rendements en sucres et protéines par rapport au 2x2 kbars est de + 5 % et + 8 % respectivement. Il n'y a pas eu plus de lipides extraits à 3x2 kbars. Au regard des résultats, la condition de lyse de HPV est fixée à 2x2 kbars. L'amélioration des rendements à 3x2 kbars est soit inexistante ou pas assez importante pour motiver les coûts qui découleraient de ces conditions de lyse. Ainsi la teneur en lipides maximale extraite est de 11 %. Les teneurs en pigments extraits de la biomasse de HPV sont estimées à 2 % pour les chlorophylles et à 1 % pour les caroténoïdes. Si l'on calcule le ratio caroténoïdes/chlorophylles, on obtient donc une valeur de 0,5 ce qui est en accord avec des études antérieures (Kobayashi *et al.*, 1997).

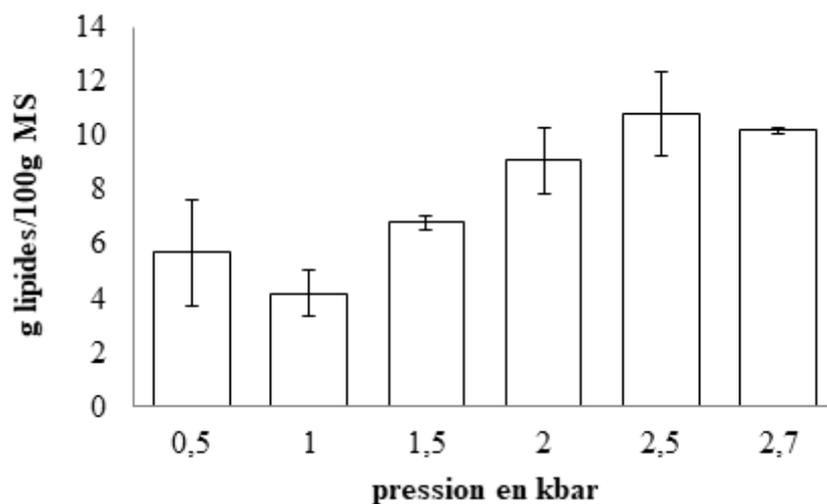


Figure 26 Influence de la pression sur le rendement d'extraction des lipides de HPV

Comme pour HPV, HPR a été broyé à des pressions allant de 0,5 à 2,7 kbar. Le rendement en lipides passe de 5 à 14% entre 0,5 et 2,7 kbars (Figure 27) avec une hausse significative à chaque condition de pression. Etant donné que la pression maximale est de 2,7 kbars avec le broyeur TS HAIVA, l'influence de la pression ne peut plus être étudiée au-delà de ce maximum. Nous nous sommes donc intéressés à l'impact de la répétition du broyage à 2,7 kbars sur le rendement d'extraction. A l'instar de ceux de HPV, les rendements des pigments de HPR n'ont pas augmenté avec le nombre de passage. La quantité maximale de pigments extraits est de 2 % pour les caroténoïdes et 1 % pour les chlorophylles. En ce qui concerne les sucres et les

protéines, une amélioration notable de leur rendement a été possible uniquement à 2x2,7 kbars. S'agissant des protéines, le rendement à 2x2,7 kbars est à 10% de la MS de HPR contre 7 % à 1 passage à 2,7 kbars. De 18 % de sucres extraits à 1x2,7 kbars ; le rendement passe à 26 % à 2x2,7 kbars et n'augmente pas au troisième passage. Enfin les rendements des lipides dosés sont passés de 14 à 1x2,7 kbars à 16% puis à 22% respectivement à 2x2,7 kbars et 3x2,7 kbars.

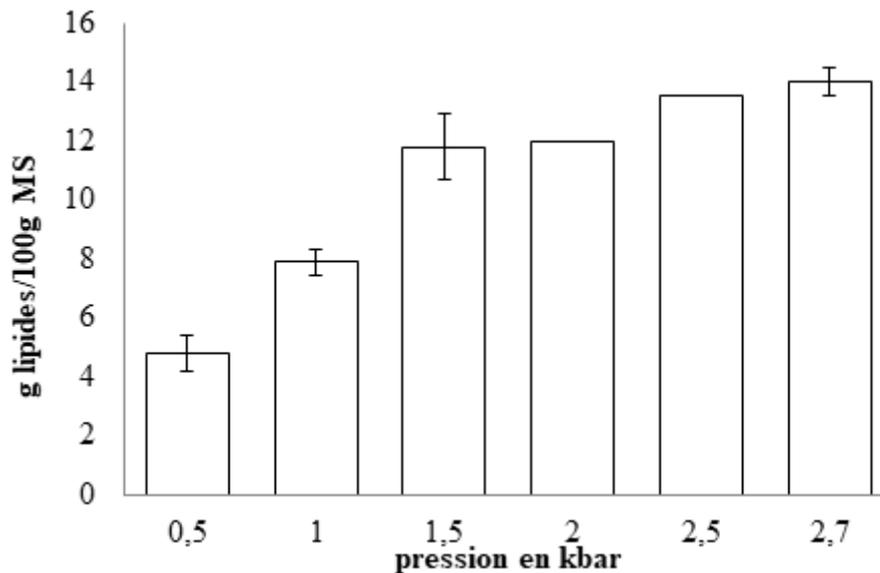


Figure 27 Influence de la pression sur le rendement d'extraction des lipides de HPR

Le broyage à 3x2,7 kbars améliore le rendement en lipides extraits, cependant il n'a pas une influence significative sur les rendements en pigments, en sucres et en protéines. Ainsi dans la suite des travaux, le broyage de HPR sera effectué à 2x2,7 kbars. Dans ces conditions la teneur maximale en lipides extraits est de 16% et celles des pigments sont à 1 et 2 % respectivement pour les chlorophylles et les caroténoïdes. Si l'on calcule le ratio caroténoïdes/chlorophylles, on obtient donc une valeur de 2. Ce ratio a donc été multiplié par 4 par rapport à la souche HPV, ce qui traduit bien une accumulation de caroténoïdes. Néanmoins, cette valeur est inférieure à ce qui a été reporté dans la littérature, Kobayashi et al. (1997) proposant une valeur de 7 pour leur biomasse.

La teneur maximale en lipides extraits de HPR (22 % à 3x2,7 kbars) est plus faible que celles reportées dans la littérature. En effet, *H. pluvialis*, sous certaines conditions de culture, est capable d'accumuler jusqu'à 35 à 40 % de sa MS en lipides (Damiani *et al.*, 2010 ; Zhekisheva *et al.*, 2002). Nos valeurs les plus faibles en teneur en lipides et en ratio

caroténoïdes/chlorophylles semblent montrer que la biomasse a été récoltée avant que l'accumulation ne soit maximale. Néanmoins, l'augmentation de la teneur en lipides entre HPV et HPR est flagrante (22 % contre 11 % pour HPV). Cette différence s'explique par la synthèse de caroténoïdes chez HPR qui est positivement corrélée à la production de lipides (Zhekisheva *et al.*, 2002). Les caroténoïdes sont sécrétés dans des globules gras qui sont composés essentiellement de lipides, et en particulier de tri-acyl glycérol (TAG ; Peled *et al.*, 2011). De fait, le profil des lipides de notre souche de HPR est composé de 86% de lipides neutres contre 79 % chez HPV. Ces lipides neutres sont principalement sous forme de TAG, de l'ordre de 64 % chez HPV et 67 % chez HPR. Le reste des lipides identifiés sont des lipides polaires qui sont plus importants chez HPV (21 %) que chez HPR (14 %).

Une analyse des acides gras (AG) révèle que leur nombre de carbone varie de 13C à 22C (Figure 28). Les acides gras de HPR possèdent de plus longues chaînes que ceux de HPV, il en va de même pour la distribution en acides gras insaturés. Les AG de plus de 18C ainsi que les acides gras insaturés constituent 77 % chez HPR contre 67 % chez HPV. Les plus représentés chez les deux formes sont les acides palmitique (C16:0), linolélaïdique (C18:2 n-6 trans) et alpha-linolénique (C18:3 n-3). L'acide palmitique atteint 30 % des acides gras totaux de HPV, tandis qu'il plafonne à 20 % pour HPR. L'acide alpha-linolénique compose 30 % des acides gras de HPV contre 18 % de ceux de HPR. La tendance est inversée avec l'acide linolélaïdique plus représenté chez HPR (30 %) que chez HPV (22 %). L'acide oléique (18:1 n-9 cis) est l'un des acides gras majoritaires de HPR parce qu'il s'agit d'un composant majoritaire des globules gras (Peled *et al.*, 2011; Zhekisheva *et al.*, 2002). Sa présence chez HPV, bien qu'en plus faible quantité par rapport à HPR, pourrait être due à la synthèse de caroténoïdes déjà amorcée. La Figure 28 nous révèle aussi que de manière générale, le profil d'acides gras ne varie pas avec le broyage chez HPR. En ce qui concerne HPV, le profil de sa biomasse entière est différent de celui des cellules broyées pour certains acides gras dont les principaux (palmitique, linolélaïdique et alpha linoléinique). Cette différence de teneur en acides gras, en faveur des cellules non lysées, peut être le résultat d'une oxydation des lipides lors de leur broyage. Des comportements similaires ont été notés lors de l'extraction des lipides de *C. vulgaris* (Zhang *et al.*, 2008).

La quantité de lipides peut atteindre 50 voire 70 % de la biomasse sèche chez certaines microalgues appartenant aux genres *Botryococcus*, *Dunaliella*, *Isochrysis*, *Nannochloropsis*, *Tetraselmis*, *Phaeodactylum*, *Chlorella* ou *Schizochytrium*. La teneur en lipides mesurée dans notre biomasse d'*H. pluvialis* semble donc relativement faible au regard de ces souches mais

d'autres études on mis en évidence des conditions de culture permettant d'atteindre 40 % de la MS en lipides (Damiani *et al.*, 2010). En revanche, en ce qui concerne la nature de ces lipides, la proportion importante de TAG est un point favorable à l'utilisation d'*H. pluvialis* pour la production de biodiesel. De plus, les acides gras identifiés montrent un taux relativement faible d'acides gras portant plus de 4 insaturations. Ce critère a son importance car ces AG polyinsaturés sont plus sujets à l'oxydation durant le stockage, ce qui réduit leur utilisation potentielle comme biodiesel (Chisti, 2007).

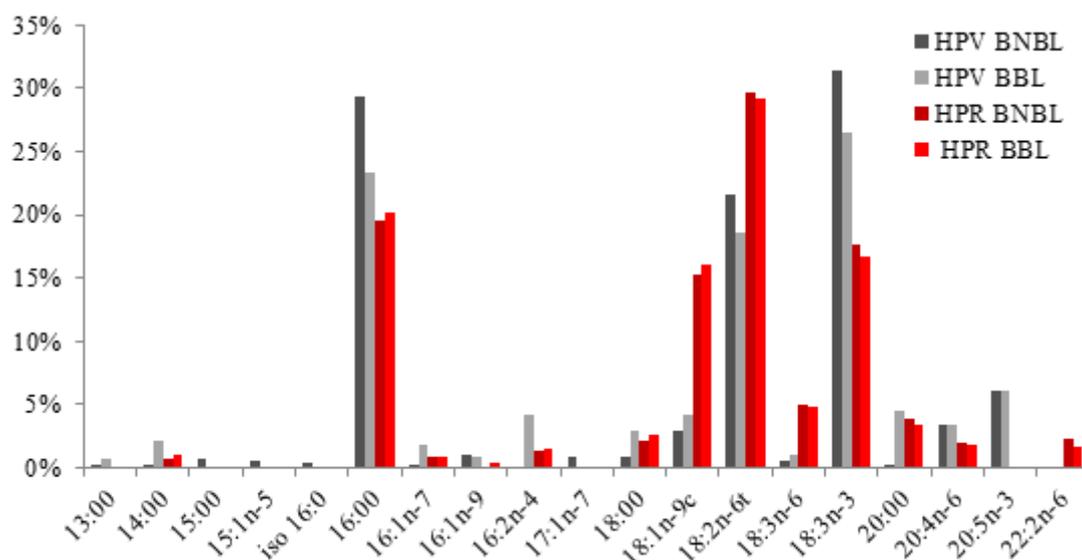


Figure 28 Profil d'acides gras des biomasses lyophilisées broyées (BBL) ou non broyées (BNBL) de HPR et HPV.

Grâce à la lyse cellulaire nous avons donc pu estimer la teneur maximale en lipides et en pigments extractibles des deux formes de *H. pluvialis* et ainsi évaluer l'efficacité des opérations unitaires de fractionnement à venir. Par la même occasion nous avons pu fixer les conditions de broyage optimales pour extraire nos composés d'intérêts.

5. Conclusion partielle

Dans la composition élémentaire d'HPV et d'HPR on note des minéraux essentiels à l'alimentation humaine. La composition primaire des protéines de *H. pluvialis* permet de calculer leur teneur totale et le facteur de conversion azote-protéine (FAP). Le profil en acides aminés (AA) renseigne sur la qualité nutritionnelle des protéines de *H. pluvialis*. Selon les standards de la FAO, les protéines de cette microalgue sont de haute qualité (les acides aminés essentiels ont un score supérieur à 0,95) et peuvent donc être destinés à l'alimentation humaine si aucune autre voie de valorisation économiquement plus intéressante n'est trouvée. La

majorité des lipides de *H. pluvialis* sont des TAGs, matière première à la production de biodiesel et les acides gras majoritaires identifiés portent au maximum 3 insaturations, ce qui confirme son intérêt comme matière première pour la mise en place d'une bioraffinerie de 3^{ème} génération.

Les composés d'intérêts de *H. pluvialis* ont été quantifiés sur la biomasse entière ainsi que sur les produits du broyage (surnageant et culot). La

Figure 29 reprend les résultats obtenus pour HPV et HPR. Pour HPV, les teneurs en composés hydrosolubles (protéines et sucres) constituent plus de 50 % de la biomasse totale. Les lipides représentent 11 % et les pigments chlorophylliens (2 %) sont majoritaires par rapport aux caroténoïdes (1 %). Les cendres atteignent 6 % de la biomasse totale tandis que les 10 % restant sont des fibres solubles et insolubles. La répartition des composés d'intérêts après le broyage montre que le broyage à haute pression a permis un fractionnement sommaire des composés. En effet 63 % des sucres et protéines de la biomasse initiale se retrouvent dans le surnageant où ils sont majoritaires. Ces deux familles de molécules ont récemment attiré l'attention pour leur potentiel en tant qu'agent fonctionnel chez des microalgues tels que *T. suecica*, et *C. vulgaris* (Schwenzfeier *et al.*, 2011, 2013, 2014; Ursu *et al.*, 2014). A ce jour, le potentiel des protéines de *H. pluvialis* n'a pas été investigué.

En comparaison à HPV, la biomasse de la forme rouge est plus riche en sucres (50 %) et en lipides (16 %) mais contient moins de protéines (15 %). Les cendres atteignent 7 % de la biomasse et les fibres solubles sont estimées à 4 %. La répartition des composés d'intérêts se fait de manière équitable entre le surnageant et le culot. Le choix du broyage haute pression comme technique de lyse cellulaire s'est avéré efficace. Des paramètres optimaux ont été déterminés et ils ont permis de maximiser les rendements d'extraction. Les observations des culots de centrifugation après broyage ont montré un aspect « bicouche » avec un culot coloré recouvert d'un dépôt blanc. L'analyse de ce dépôt a montré qu'il s'agit d'amidon pur. Une stratégie assez simple reposant sur deux centrifugations successives à des vitesses différentes doit donc permettre d'obtenir l'isolation de l'amidon. Les autres composés d'intérêts sont distribués entre les surnageants et les culots qui deviennent des matrices complexes. Par la suite, différentes techniques de fractionnement seront mises en œuvre afin de pouvoir séparer ces composés et tenter de les valoriser individuellement.

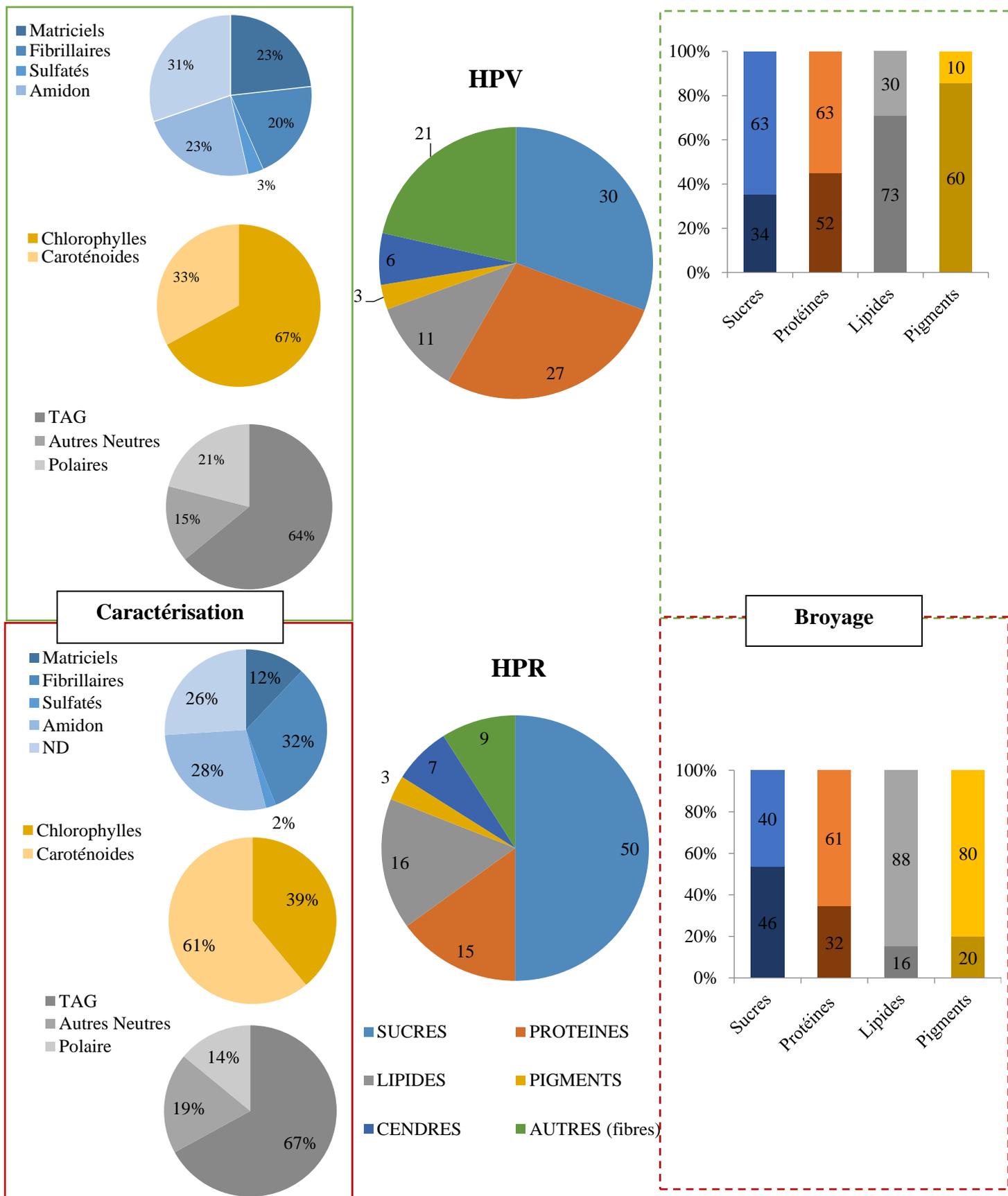


Figure 29 Quantification et caractérisation des biomasses HPR et HPV. Après broyage (histogrammes à droite), répartition des composés dans le surnageant et le culot de broyage.

Partie 2 Etude des extraits protéiques de HPV et identification d'une potentielle valorisation comme agent émulsifiant

L'étude des extraits de HPV enrichis en protéines hydrosolubles a débuté avec l'évaluation des différentes conditions de lyse. L'impact du broyage à haute pression, associé ou non à une variation de pH, a été évalué sur le rendement d'extraction des protéines. Ces dernières ont ensuite été caractérisées, puis des essais de fractionnement et de concentration ont été mis en œuvre. Après ces différentes étapes, le potentiel de la matrice globale de protéines microalgales en tant qu'agent émulsifiant a été évalué.

1. Précipitation acide et pI des protéines de HPV

Dans un premier temps l'objectif est de déterminer la teneur maximale en protéines extractibles de HPV. Deux paramètres jouent sur le rendement de la solubilisation des protéines : la pression lors du broyage haute pression et le pH. En effet, d'après les travaux d'Ursu et al. (2014) sur une souche de *Chlorella vulgaris*, une extraction alcaline des protéines de microalgues améliore leur rendement de solubilisation. La même tendance a été récemment observée au laboratoire sur une souche d'*Arthrospira platensis* (résultat non publié). L'influence de ce paramètre sur le rendement de la solubilisation a donc été étudiée dans le cas d'*Haematococcus pluvialis*. Ainsi lorsque le pH d'une suspension non broyée est ramené à 12, 34 % des protéines sont solubilisées dans le surnageant alcalin. Un double passage à 2 kbars associé au pH alcalin amène le rendement en protéines solubles (PHS) à plus de 100 %. La méthode de dosage Lowry a permis de l'estimer à 34 g PHS / 100 g MS, cette valeur est supérieure à la teneur en protéine totale obtenue avec l'aminogramme (27 g / 100 g MS). Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer cette différence. Tout d'abord, la méthode utilisée pour établir l'aminogramme dégrade certains acides aminés (cystéine) qui n'ont donc pas été pris en compte dans la quantification des protéines totales. Par ailleurs, il a déjà été rapporté dans la bibliographie que le dosage de Lowry surestime la teneur en protéines lorsque le dosage est effectué dans un milieu contenant des quantités importantes de chlorophylles (Eze et Dumbroff, 1982) comme c'est le cas pour HPV. Néanmoins on peut affirmer que ces conditions de lyse ont permis d'améliorer le rendement de solubilisation des protéines. Selon Damodaran, (1996), les protéines acides sont plus solubles à pH alcalin. L'aminogramme de la biomasse initiale de

HPV présentée dans le Tableau 12 nous permet de calculer la somme des acides aminés acides (Asp et Glu, = 5,8) qui est supérieure à la somme des acides aminés basiques (Lys, Arg, His ; = 4,1). Ce calcul confirme que les protéines d'*H. pluvialis* vert sont de nature acide et donc sont plus solubles à pH alcalin.

Il faut cependant vérifier que les protéines solubilisées conservent leurs fonctionnalités à pH neutre ou acide (pH généralement rencontré dans les applications alimentaires ou cosmétique). La documentation concernant le point isoélectrique (*pI*) des protéines intracellulaires de *H. pluvialis* est peu fournie. Wang *et al.*, (2004) ont réalisé une électrophorèse bidimensionnelle sur les protéines de la paroi cellulaire de *H. pluvialis*. Ils estiment que la majorité d'entre elles possède un point isoélectrique situé entre le pH = 7 et le pH = 5. Ce surnageant, riche en protéines, contient néanmoins d'autres molécules, telles que des sucres, des lipides et des pigments. Afin d'obtenir une fraction protéique partiellement purifiée, les protéines ont été séparées en fonction de leur point isoélectrique (*pI*) en utilisant la méthode de la précipitation acide (Figure 30). L'abaissement progressif du pH de 12 à 7 permet de précipiter 8 % des protéines solubles. Le pourcentage de protéines précipitées atteint 71 % lorsque le pH est réduit à 6. En dessous de 4, le pH n'a pas d'impact significatif et la quantité des protéines précipitées à partir du surnageant alcalin plafonne à 83 % au pH = 2 (Figure 30).

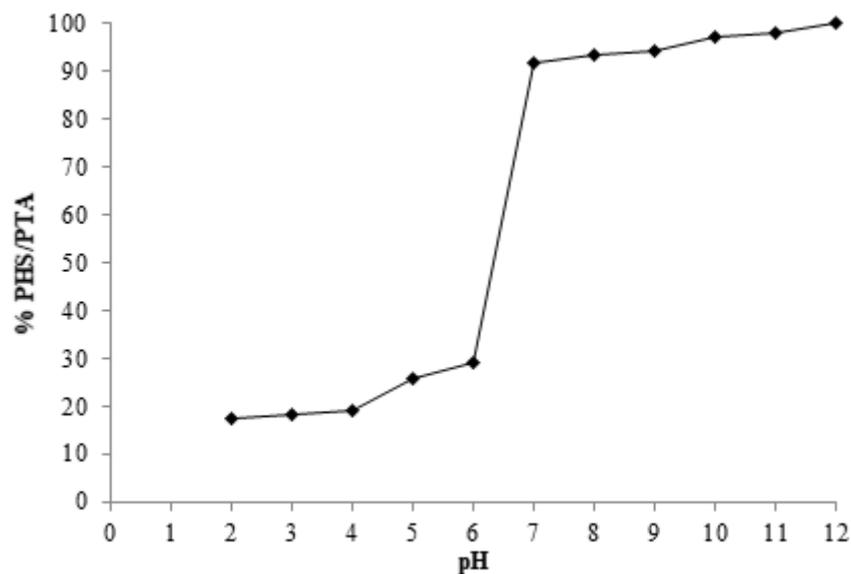


Figure 30 Courbe de solubilité des protéines du surnageant alcalin HPV (broyage réalisé à pH = 12, 2x2 kbars).

Nos résultats sur les protéines intracellulaires de HPV suggèrent donc qu'elles ont un point isoélectrique similaire à celui de la bibliographie, celui-ci étant compris entre pH = 7 et pH = 5

avec une majorité qui précipite à pH = 6. Cette valeur de *pI* est proche de celle des protéines végétales (5,5-6,5) utilisées dans la formulation de produits agro-alimentaires. Le *pI* des protéines intracellulaires issues du chlorophyte *Tetraselmis suecica* est entre pH = 5 et pH = 6 et celui des phycobiliprotéines de cyanobactéries entre 4,7 et 5,3. La disparité entre les valeurs de *pI* implique que le point isoélectrique est une valeur souche ou organisme dépendants (Glazer et Cohen-Bazire, 1971; Schwenzfeier *et al.*, 2011).

Afin d'évaluer le potentiel techno-fonctionnel de ces protéines précipitées, il est nécessaire de les resolubiliser. Chaque précipité est donc remis en solution et le pH est ramené à 12 afin de favoriser la solubilisation (Figure 31). Cependant, la mise en solution de ces précipités dans de l'eau a mis en évidence des difficultés à les solubiliser intégralement. Ainsi 59 % des protéines précipitées à pH = 10 parviennent à être remises en solution, ce qui représente 0,06 g de protéines. En ce qui concerne les autres précipités, le pourcentage de resolubilisation varie entre 8 et moins de 35 % quelque soit le pH de précipitation. Le pourcentage de protéines resolubilisées dépend donc de leur pH de précipitation. D'après Jiang *et al.*, (2009) qui ont fait une observation similaire sur des protéines de soja, ce phénomène serait la conséquence du « dépliement » des molécules protéiques. Ce changement de structure entraîne la formation d'agrégats hydrophobes et les protéines perdent leur solubilité notamment en milieu alcalin.

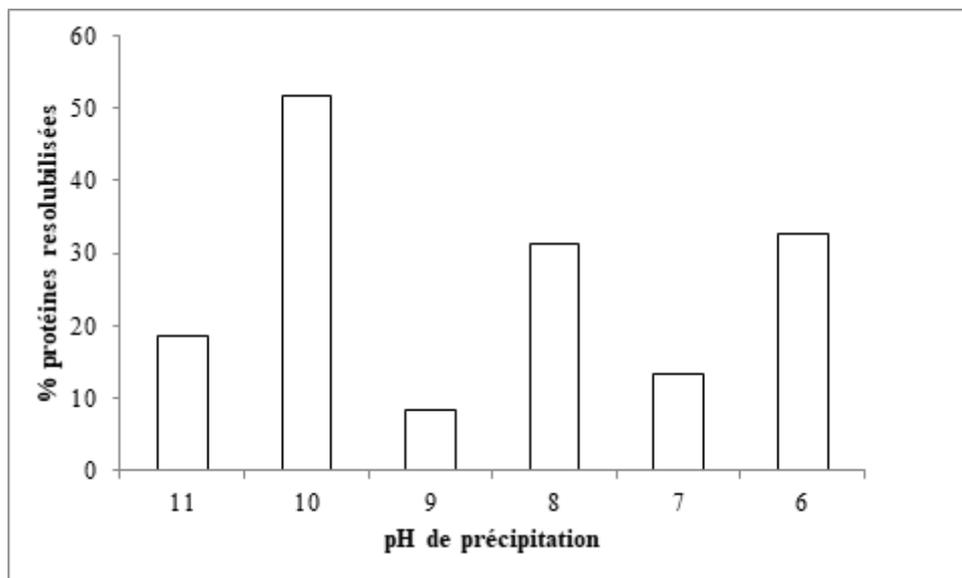


Figure 31 Influence du pH de précipitation sur la re-solubilisation en condition alcaline des protéines précipitées par ajout d'acide.

Cela pourrait être un problème majeur car pour la plupart des applications impliquant des protéines, il est important qu'elles aient une bonne solubilité. Il est donc nécessaire de trouver un compromis afin d'extraire et de purifier un maximum de protéines sans les endommager. Dans la suite de ce travail, la précipitation acide n'a donc pas été retenue comme méthode de purification des protéines issues du surnageant. Par ailleurs, le broyage à pH alcalin pouvant être à l'origine de cette perte de solubilité par modification de leur structure et de leurs propriétés, d'autres essais de broyage ont été réalisés à pH natif (pH = 5,7) et à pH neutre (pH = 7).

2. Extraction des protéines sous haute pression et à différent pH (natif et neutre)

Le rendement en protéines extraites à pH natif sans traitement à haute pression s'élève à 23 ± 1 % des protéines totales (Figure 32). Cette valeur est supérieure au 6,5 % rapporté par Safi *et al.*, (2012). Cet écart de rendement peut être lié soit à une différence de structure et/ou composition de la paroi cellulaire (enkystée ou non), soit à la méthode utilisée pour la conservation des cellules de microalgues. La forme initiale de la biomasse, séchée dans l'étude de Safi *et al.*, (2012) et congelée pour la nôtre, pourrait modifier le comportement des cellules. En effet, les cellules ont pu être partiellement lysées durant leur conservation à -20°C .

La Figure 32 illustre également l'influence de la pression sur l'extraction des protéines à partir d'une suspension de *H. pluvialis* à un pH natif (5,7). Le rendement de protéines solubles extraites s'accroît en appliquant une pression de 0,5 bar et passe de 34 ± 5 % à 56 ± 4 % lorsque la pression passe de 0,5 à 2 kbars. Cela laisse supposer que la pression altère davantage la structure cellulaire, ce qui permet l'écoulement de l'eau à travers la membrane. Notons que l'augmentation de la pression au-dessus de 2 kbars n'a pas permis d'augmenter la quantité de protéines solubles et donc l'influence du nombre de passages a été testée à cette pression. Augmenter le nombre de passages de 1 à 2 et à 3 sous 2 kbars améliore le rendement d'extraction de protéines (56 ± 4 % contre 64 ± 1 % et 72 ± 4 %). Néanmoins, la condition d'extraction a été réglée à 2 passages et 2 kbars. En effet les rendements des autres composants d'intérêt, comme les pigments et les lipides, ne sont pas améliorés par un 3^{ème} passage (cf partie 1). Par ailleurs, le gain de solubilisation des protéines par ce troisième passage a été jugé insuffisant au regard de l'énergie électrique (et donc le coût) nécessaire pour les extraire.

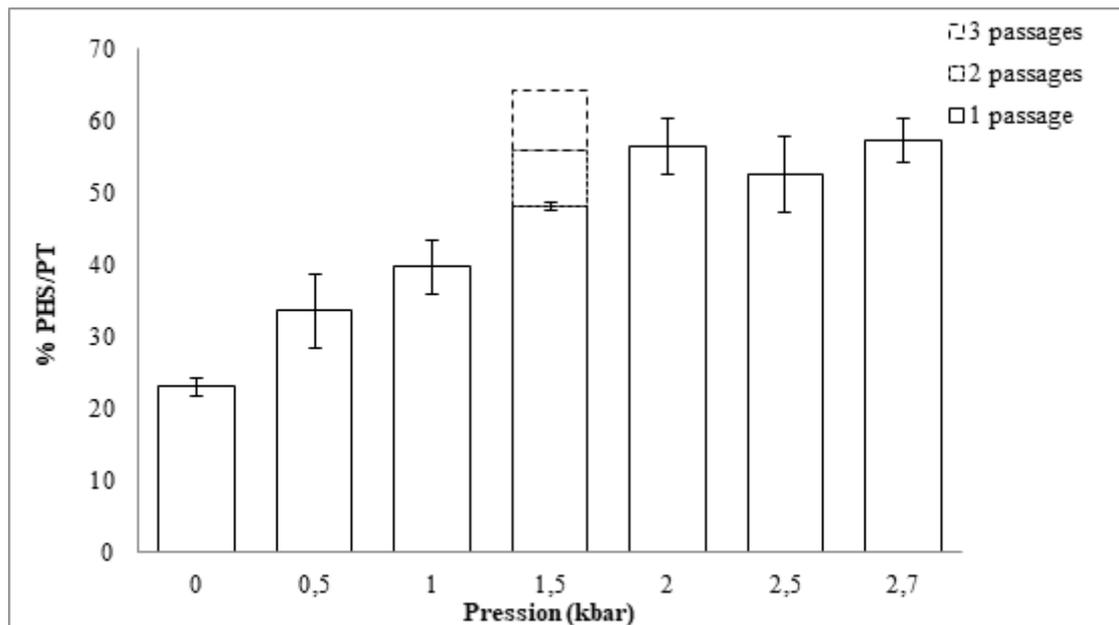


Figure 32 Effet de la procédure d'extraction (pression, nombre de passage à 2kbar) sur le rendement en protéines hydrosolubles (PHS) extraites des protéines totales (PT) de la biomasse de HPV.

La variation du pH de 5,7 à pH = 7 sans traitement à haute pression permet d'extraire 27 ± 3 % des protéines totales, soit 4 % de plus par rapport au rendement de protéines extraites à un pH natif sans traitement HP (23 ± 1 %). Les rendements en protéines libérées à pH = 7 et à pH = 5,7 sont donc équivalents. En revanche, associé à un traitement HP (2x2 kbars), le changement de pH à 7 nous a permis d'améliorer le rendement de solubilisation/extraction des protéines de 64 ± 1 % (2x2 kbars à un pH natif) à 73 ± 2 % (2x2 kbars à pH = 7). Il semble que l'association de la pression et du pH neutre a accentué l'affaiblissement de la paroi cellulaire. Pour *H. pluvialis*, dont la paroi cellulaire est essentiellement composée de protéines (75 %) et de sucres (19 %) (Hagen *et al.*, 2002), la hausse du pH favorise la perméabilisation de la paroi cellulaire ainsi que l'extraction des protéines.

3. Caractérisation et propriétés émulsifiantes

Les protéines extraites au deux pH (natif et pH alcalin) ont été analysées par électrophorèse SDS-PAGE comme décrit au paragraphe 3.2.2.2 de la section Matériels et Méthodes. Ce type d'électrophorèse permet d'observer la répartition des poids moléculaires des sous-unités constitutives des protéines puisqu'elle se déroule en conditions dénaturantes. L'électrophorégramme présenté sur la Figure 33 révèle deux profils de distribution de poids moléculaires selon le pH d'extraction. A pH natif, les masses molaires varient de 25 kDa à plus de à 250 kDa. Lorsqu'on extrait les protéines à pH = 12, les bandes correspondant aux poids

moléculaires supérieurs à 75 kDa disparaissent. La perte des fractions de haut poids moléculaires pourrait être une conséquence du pH alcalin. En effet, le pH = 12 provoque un dépliement de la structure des protéines.

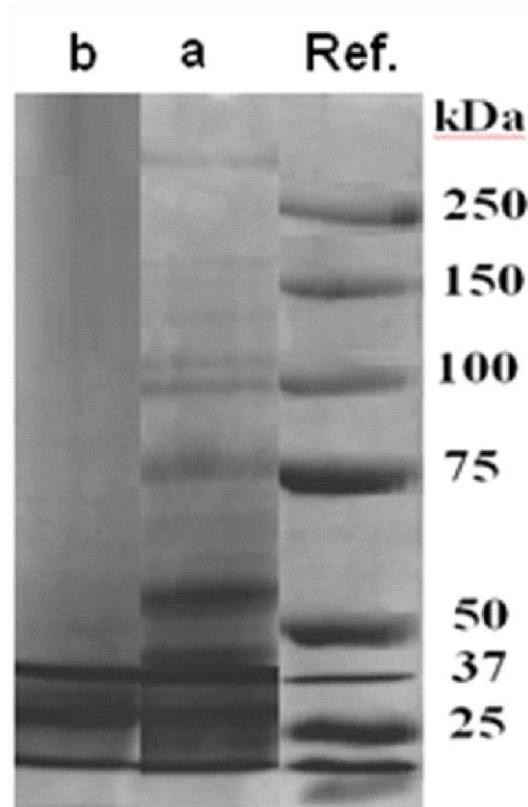


Figure 33 Distribution des masses molaires des protéines extraites et solubilisées à pH natif (5,7 ; a) et à pH alcalin (12 ; b) et analysées en SDS-PAGE.

L'étude de la répartition des poids moléculaires des protéines extraites à pH natif a également été réalisée par chromatographie d'exclusion stérique (CES), ce qui correspond cette fois à des protéines non dénaturées (Figure 34). Le profil a montré une large répartition des masses moléculaires de 584 à 17 kDa. D'autres petites molécules (< 10 kDa) ont également été détectées. Elles correspondent à des peptides et des acides aminés libres, comme révélé par les analyses obtenues sur une colonne Superdex peptide 10/300 GL. Quant au profil CES des protéines extraites à pH neutre, il révèle la présence d'un pic correspondant à un poids moléculaire supérieur à 600 kDa, composé de protéines, de chlorophylle (660 nm) et de caroténoïdes (470 nm). Cela pourrait être un agrégat de protéines-pigments formé à partir de la combinaison des contraintes mécaniques et des modifications chimiques appliquées au cours de l'extraction. En effet, Ursu et al. (2014) ont observé le même phénomène lors de l'étude des protéines de *Chlorella vulgaris* extraites à pH alcalin.

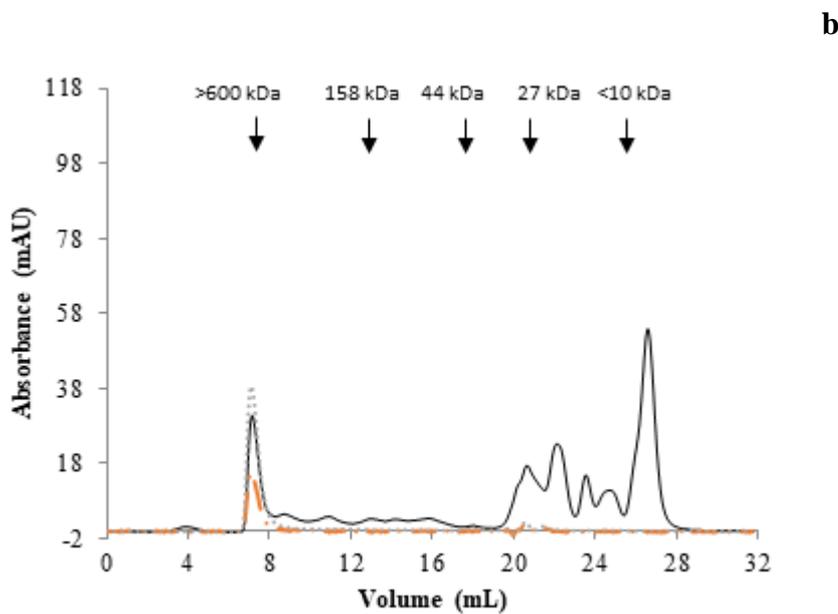
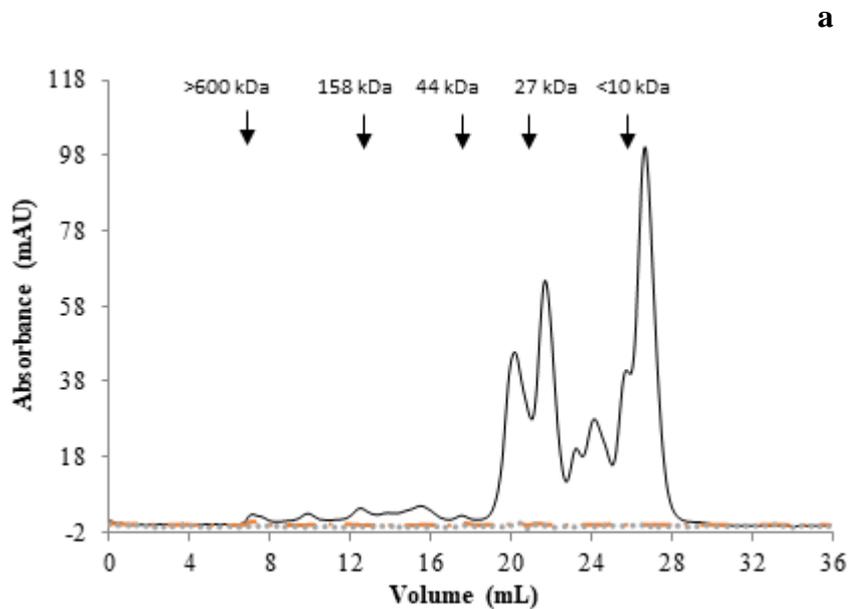


Figure 34 Profils CES des protéines hydrosolubles (---), des pigments chlorophylliens (....) et caroténoïdiens (___) du surnageant extrait à pH natif (a) et à pH neutre (b). Les poids moléculaires indiqués par des flèches correspondent aux marqueurs de taille utilisés pour la calibration de la colonne. Colonne superdex 200, gamme de résolution entre 10 et 600 kDa.

Afin de quantifier les propriétés émulsifiantes, les surnageants lyophilisés ont été solubilisés à une concentration de 6 g/L. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec le caséinate de

sodium à la même concentration. Le Tableau 13 montre que les capacités émulsifiantes (CE) des matrices contenant les protéines de *H. pluvialis* vert sont similaires entre les différents échantillons (surnageants à pH natif ou neutre). Par contre elles sont légèrement inférieures à la capacité émulsifiante du caséinate (de 16 % et 19 % respectivement). La meilleure capacité émulsifiante du caséinate de sodium pourrait être liée à la structure naturellement dissociée et dépliée de ses protéines. De plus, le rapport des acides aminés hydrophobes sur les protéines totales du caséinate (40 %, Sindayikengera et Xia, 2006) est légèrement plus important que celui de *H. pluvialis* (36 %, valeur calculée d'après l'aminogramme). Cette différence peut également expliquer la capacité émulsifiante supérieure du caséinate de sodium. En effet, il y a une corrélation positive entre la capacité émulsifiante et l'hydrophobicité sachant que cette dernière est liée à la teneur en acides aminés apolaires des protéines (Zayas, 1997).

Les résultats du Tableau 13 révèlent que 24 h plus tard, le surnageant obtenu à pH = 7 a une stabilité supérieure à celle du surnageant au pH natif (5,7). Les émulsions préparées avec ces deux extraits de *H. pluvialis* présentent des stabilités plus élevées que celle du caséinate de sodium: 25% de plus pour les protéines hydrosolubles obtenues à pH natif et 33% pour les protéines solubilisées à pH neutre. La différence de stabilité, favorable aux surnageants de *H. pluvialis*, peut être expliquée par la présence de protéines hydrosolubles de haute masse molaire. Ces macromolécules améliorent les forces stériques qui à leur tour favorisent la formation d'émulsions stables. En outre, les molécules de hautes masses molaires limitent le phénomène de coalescence et agissent contre la dégradation de l'émulsion (Damodaran, 2005 ; Choplin et al., 2006). L'importante valeur de l'index d'activité émulsifiante (IAE) associée à la stabilité reflète une grande surface interfaciale. La déstabilisation de l'émulsion due à la coalescence est probablement freinée par les composés de hautes masses molaires (Selmane *et al.*, 2010; Dickinson and Stainsby, 1982).

Tableau 13 Propriétés émulsifiantes: capacité émulsifiante (CE, mL d'huile / g de protéines), stabilité d'émulsification (SE, %) et index de l'activité émulsifiante (IAE, m²/g) des surnageants à pH natif (5,7) et neutre

Echantillons	Propriétés émulsifiantes		
	CE	SE	IAE
Surnageants			
pH = 5,7	558 ± 7	84 ± 3	55 ± 2
pH = 7	534 ± 41	94 ± 3	80 ± 1
CaNa	664 ± 30	63 ± 4	56 ± 4

Une comparaison absolue des propriétés émulsifiantes des protéines est délicate car les méthodes utilisées pour les estimer ne sont pas normalisées. Cependant, la même tendance a été observée avec la capacité (CE) et la stabilité émulsifiante (SE) de *C. vulgaris* et de *T. suecica*. La CE du surnageant de *C. vulgaris* extrait à pH = 7 est 20 % plus faible que celle de la valeur de référence, tandis que l'émulsion faite à partir du surnageant est plus stable (+ 26 %) que la référence (Ursu *et al.*, 2014). Les résultats reportés par Schwenzfeier *et al.*, (2013) ont montré que l'isolat protéique de blé est un meilleur émulsifiant que les protéines solubles de *T. suecica*. Cependant les protéines de la microalgue permettent de stabiliser les émulsions dans une gamme de pH plus large.

De manière globale, la comparaison entre les deux matrices obtenues à pH initial et à pH neutre est favorable au surnageant à pH = 7. L'association du traitement mécanique et chimique a permis d'extraire des protéines avec un profil de poids moléculaires intéressant pour une éventuelle valorisation en émulsion. Au-delà de ces précédentes considérations, ces résultats indiquent l'intérêt d'utiliser les extraits de *H. pluvialis* comme agent émulsifiant. Les propriétés des surnageants sont équivalentes voire meilleures que celles du caséinate de sodium, une référence utilisée en industrie comme agent émulsifiant.

Toutefois, la composition initiale des surnageants a révélé qu'ils avaient une quantité similaire de lipides, alors que le surnageant natif contenait 11% de plus de glucides et 18% de moins de protéines que le surnageant à pH = 7. Les glucides et les lipides peuvent avoir une influence sur les propriétés fonctionnelles des extraits de HPV. Il apparaît donc l'importance d'isoler les protéines afin d'évaluer plus précisément leur potentiel.

4. Concentration et fractionnement des protéines

Dans cette partie, les principaux résultats concernant la concentration et le fractionnement des surnageants issus de HPV seront présentés. Deux techniques ont été mises en œuvre : l'ultrafiltration et la précipitation par le sulfate d'ammonium. En parallèle, les propriétés fonctionnelles des produits issus des essais de concentration et de fractionnement sont évaluées. Elles sont comparées à la fois aux valeurs des surnageants de broyage de départ ainsi qu'au caséinate de sodium.

4.1. Ultrafiltration

Les surnageants de broyage à pH initial et pH neutre ont été concentrés par ultrafiltration avec une membrane de seuil de coupure 1 kDa. Les paramètres opérationnels ont été fixés à 3,3 et 1

bar pour la PTM et la ΔP respectivement. L'expérience a été menée sur un volume de surnageant de 5 L et le facteur de concentration volumique (FCV) est fixé à 10. Le FCV est le ratio entre le volume initial de surnageant et celui du rétentat final en prenant en compte le volume mort de l'unité de filtration.

A la sortie de la filtration, la concentration en protéines a été mesurée dans les perméats et les rétentats finaux. Le facteur de concentration protéique (FCP), rapport entre la concentration protéique du rétentat final et celle du surnageant, est de 3,5 pour le surnageant à pH natif et 3,3 pour celui à pH 7. Ces valeurs montrent que l'ultrafiltration à 1 kDa est donc une méthode adéquate pour concentrer les protéines dans le rétentat. La Figure 35 récapitule les étapes utilisées, du broyage à la concentration par UF.

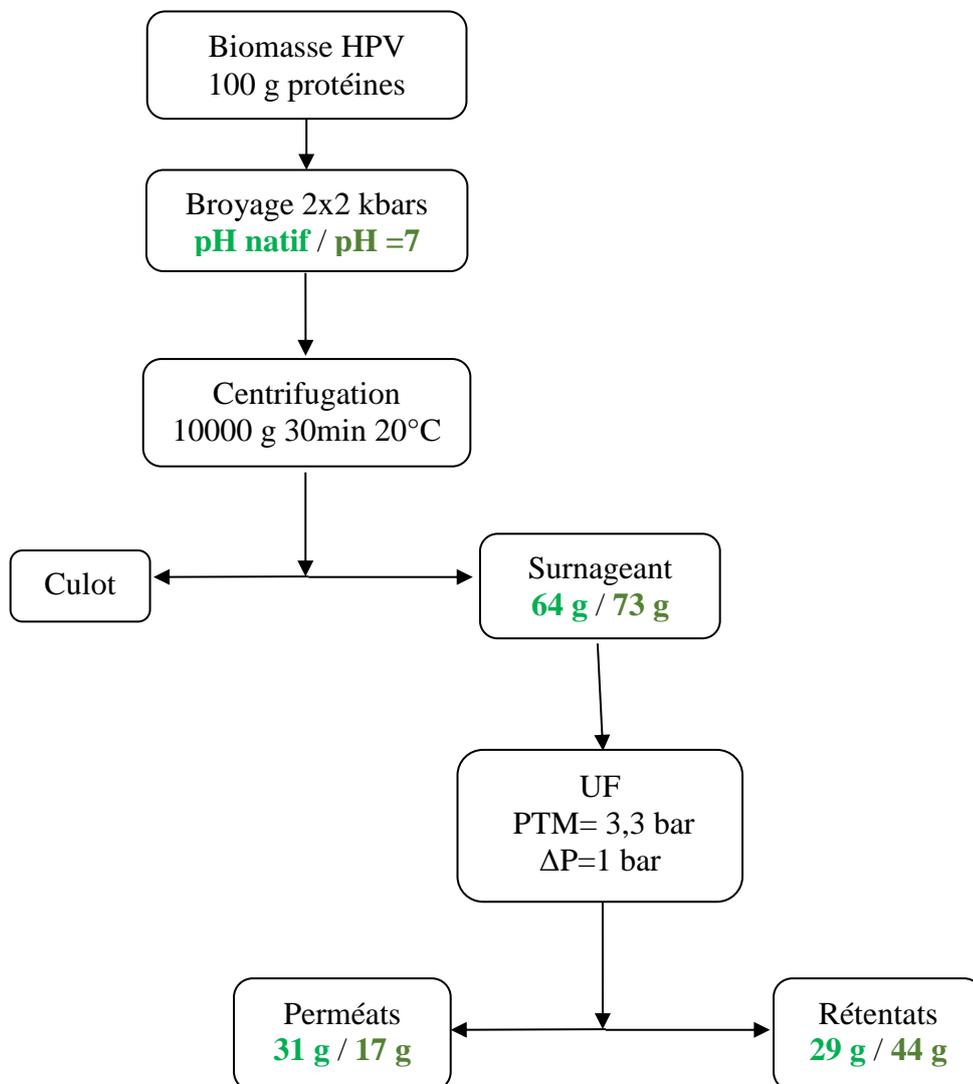


Figure 35 Bilan global d'une extraction/concentration des surnageants de broyage de HPV à pH natif ou neutre sur une base de 100 g de protéines initiales.

La répartition des masses molaires des protéines a été déterminé par CES pour le perméat, le rétentat et le surnageant dans chacune des deux conditions d'extraction (Figure 36). Les chromatogrammes des perméats révèlent la présence de petites molécules protéiques dont les poids moléculaires ne dépassent pas 10 kDa. De la même façon, dans la gamme des faibles poids moléculaires (< 20 kDa), les chromatogrammes des deux rétentats se superposent à ceux de leur surnageant respectif. En revanche, pour le surnageant à pH natif, le profil du rétentat révèle la présence de protéines de haut poids moléculaire. L'intensité des pics est plus importante que ceux des pics correspondant au surnageant initial, ce qui traduit que ces protéines ne traversent pas la membrane et se concentrent dans le rétentat. En revanche, les pics correspondant au « grosses » protéines du rétentat à pH = 7 sont moins intenses que ceux du profil du surnageant correspondant. Les agrégats moléculaires ont pu être retenus pendant la filtration précédant l'injection en CES. Néanmoins avec ces chromatogrammes nous pouvons constater un fractionnement partiel des protéines. La majorité des peptides se retrouvent dans le perméat indépendamment du pH d'extraction.

Les propriétés émulsifiantes des rétentats et perméats sont évaluées sur des échantillons lyophilisés puis remis en solution à la concentration souhaitée. Avec le surnageant à pH natif, les protéines du perméat et du rétentat ont pu être solubilisées dans de l'eau ultra-pure à hauteur de 10 g/L et 6 g/L respectivement. Cependant les protéines du rétentat final issu du surnageant à pH = 7 n'ont pu être solubilisées qu'à hauteur de 2 g/L. La présence de composés responsables d'encombrement stérique, tels les agrégats pigments-protéines, pourrait créer une compétition avec les protéines dans leur interaction avec l'eau. De plus l'insuffisance des forces de répulsion électrostatique associée aux interactions protéines-protéines après UF affecterait négativement la solubilité protéique (Damodaran, 1996).

Afin de pouvoir comparer les valeurs de capacité émulsifiante (CE), la concentration protéique est fixée à 2 g/L pour le rétentat, le perméat et le surnageant à pH neutre. La CE du rétentat (2479 ± 65 mL/g) et celle du surnageant (2106 ± 48 mL/g) ont le même ordre de grandeur. En revanche le perméat émulsionne moins de la moitié d'huile (989 ± 53 mL/g) que le rétentat et le surnageant. La valeur de la stabilité (SE) du rétentat ($77 \pm 1\%$) est légèrement supérieure à celle du surnageant ($75 \pm 3\%$) et nettement plus importante que celle du perméat ($30 \pm 4\%$). L'index d'activité émulsifiante (IAE) suit la même tendance que la SE : 119 ± 10 , 101 ± 6 et 27 ± 3 m²/g pour le rétentat, le surnageant et le perméat respectivement. La similarité entre le surnageant et le rétentat serait le résultat de la présence de molécules de haut poids moléculaires dans ces deux fractions.

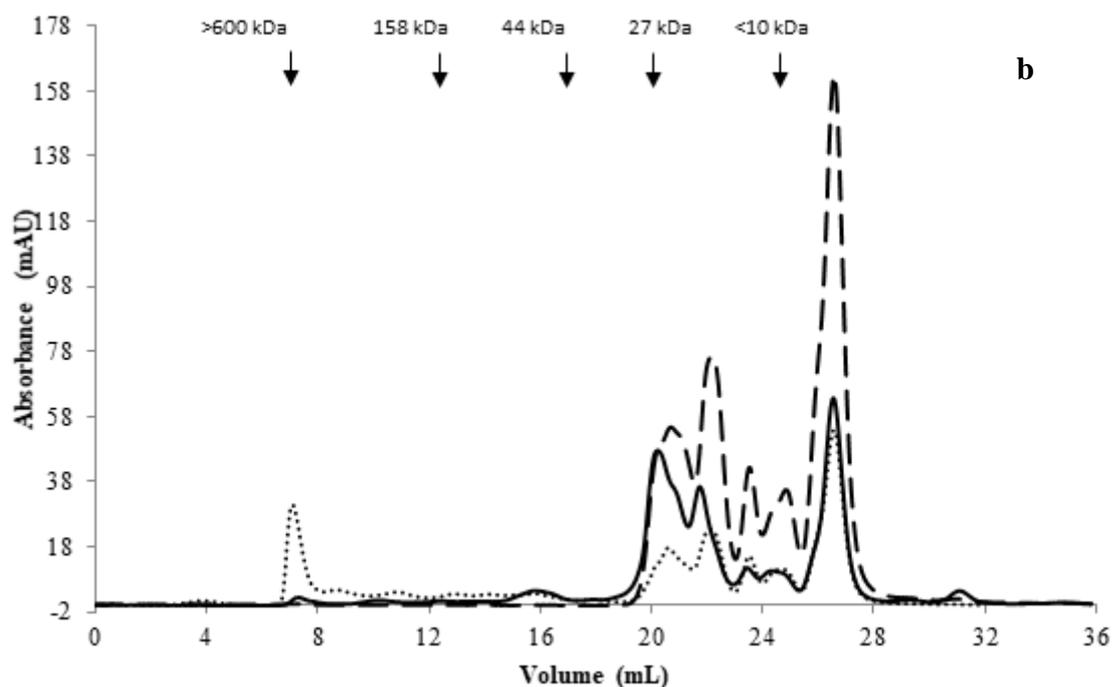
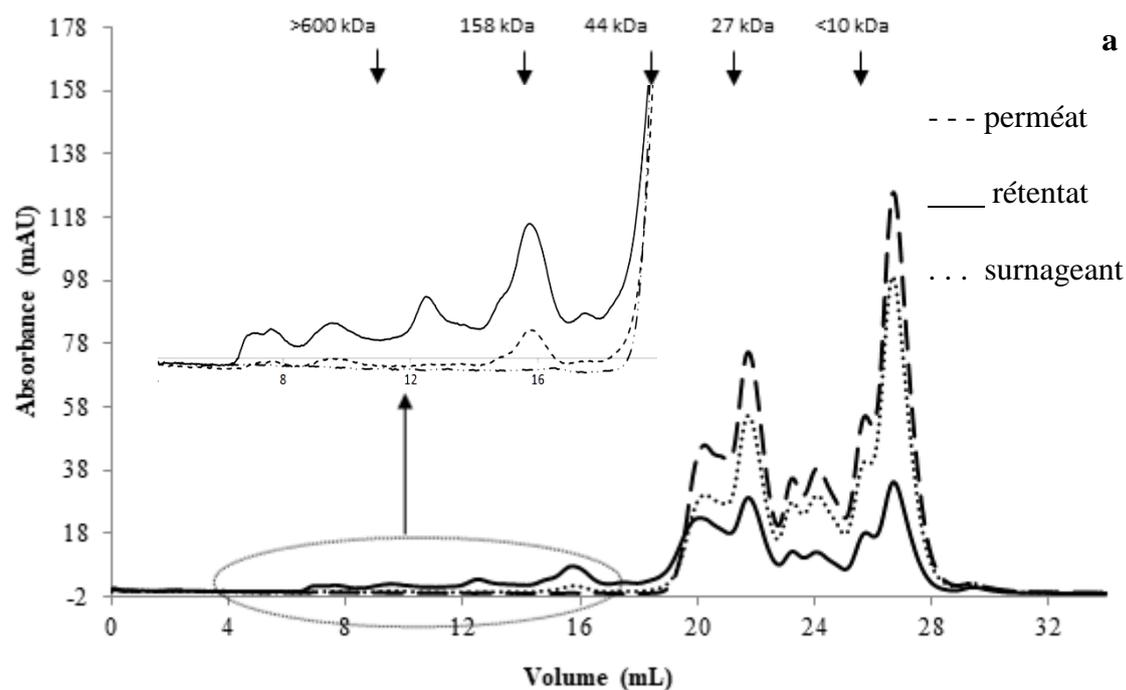


Figure 36 Profils CES des protéines des surnageants (...), perméats (- - -) et rétentats (___) à pH natif (a) et à pH neutre (b). Les poids moléculaires indiqués par des flèches correspondent aux marqueurs de taille utilisés pour la calibration de la colonne. Colonne superdex 200, gamme de résolution entre 10 et 600 kDa.

Les manipulations sont menées à 6 g/L de protéines pour les produits de l'UF du surnageant à pH initial. Les CE sont relativement proches entre les différents échantillons (surnageant, rétentat, perméat). Les valeurs de CE sont plus faibles que celles reportées pour le surnageant à pH neutre : 558 ± 7 , 589 ± 21 , et 561 ± 15 mL/g. La concentration en protéines choisie, 6 g/L, est peut-être trop élevée. En effet, il existe un seuil de concentration en protéines à partir duquel, la capacité émulsifiante diminue avec la hausse de la concentration (Sánchez et Patino, 2005; Schwenzfeier *et al.*, 2011). Par exemple, pour l'isolat protéique de *T. suecica*, cette limite est de 4 g/L à pH 7. Cependant les émulsions formées à partir du surnageant et du rétentat sont plus stables que celles du perméat (84 % versus 2,6 %). Il semble que cette faible stabilité soit due aux petites molécules protéiques présentes dans le perméat. Les molécules de faibles poids moléculaires ont très peu de forces stériques, ce qui réduit leur capacité à maintenir une émulsion stable. Le fait que l'IAE du perméat, estimé à 66 ± 2 m²/g soit plus élevée que celui du surnageant (55 ± 1 m²/g) n'est pas contradictoire. Un important IAE associé à une faible stabilité, comme c'est le cas pour le perméat, trahit une importante surface interfaciale. Dans ces conditions, la déstabilisation des émulsions par coalescence devient plus rapide car il n'y a pas de molécules pour maintenir l'émulsion (Selmane *et al.*, 2010).

On retiendra que l'UF a permis de concentrer les protéines dans le rétentat aux deux pH d'extraction (neutre et natif). Elle fractionne partiellement les protéines, celles avec des poids moléculaires élevés se retrouvent exclusivement dans les rétentats. Cependant d'autres fractions moléculaires (sucres, lipides) sont toujours mélangés aux protéines. En effet, les dosages de sucres, de lipides et de pigments réalisés sur les surnageants, rétentats et perméats (Tableau 14) montrent que dans les surnageants et les rétentats à pH natif, la teneur en sucres est plus importante que celles des autres composants. Le dosage des pigments et des lipides n'a pas été concluant pour le rétentat et le perméat. Cela ne signifie pas que les lipides et pigments sont absents de ces fractions mais uniquement qu'ils n'ont pas pu être dosés. En effet, on observe une perte en coloration due à la préparation de l'échantillon ainsi qu'à sa conservation avant et après l'UF. Pour les lipides, ils ont pu être oxydés. Pour les échantillons à pH neutre, les protéines sont en quantité plus importante que les glucides. Cette fois, les lipides ont pu être quantifiés dans les 3 fractions, montrant des teneurs proches de celle des glucides. En revanche, les teneurs en pigments n'ont pu être établis que pour le surnageant à pH neutre et elle paraît relativement faible aux regards des analyses réalisées initialement sur la biomasse et les surnageants de broyage. Pour le rétentat et le perméat, à nouveau, les quantités de pigments

n'ont pas pu être déterminées. Etant donné que les glucides et les lipides peuvent influencer les propriétés émulsifiantes des surnageants, rétentats et perméats, il apparaît important d'essayer de les séparer des protéines. La méthode de précipitation au sulfate d'ammonium a donc été testée, afin de séparer les protéines des autres constituants et pouvoir par la suite évaluer le potentiel des protéines en tant qu'agent émulsifiant.

Tableau 14 Composition en protéines, sucres, lipides et pigments des surnageants de broyages, rétentats et perméats.

pH	Echantillons	Composants (% p/p)			
		Protéines	Glucides	Lipides	Pigments
Natif (5,7)	Surnageant	26	37	18	-
	Rétentat natif	37	49	-	-
	Perméat natif	20	39	-	-
Neutre (7)	Surnageant	44	26	16	0,2
	Rétentat	44	30	26	-
	Perméat	36	21	11	-

4.2. Précipitation au sulfate d'ammonium

Les sucres affectent les propriétés techno-fonctionnelles des extraits protéiques de microalgues (Schwenzfeier *et al.*, 2013). Ainsi, il est important de vérifier s'ils ont une influence sur les propriétés fonctionnelles de la matrice hydrosoluble qu'est le surnageant. L'effet « salting-out » du sulfate d'ammonium est utilisé afin de concentrer et de purifier les protéines hydrosolubles (PHS) du surnageant à pH initial. Plusieurs pourcentages de saturation en sulfate d'ammonium (SAm) ont été testés (25, 40, 70 et 90 %). L'objectif est de trouver un compromis entre le degré de pureté des protéines isolées et le rendement de purification. Le pourcentage de précipitation protéique le plus important a été obtenu à 90% de saturation en SAm. A cette valeur de SAm, 65 ± 1 % des protéines initiales sont précipitées. Cependant plus la saturation en SAm est importante, plus les sucres sont précipités avec les protéines réduisant ainsi leur degré de pureté. En effet à 90 % de saturation en SAm, 19 % de la teneur initiale en sucres du surnageant est précipité contre 3 % à 25 % de SAm, 4 % à 40 % de SAm et 15 % à 70 % de SAm. Toutefois, comparé au surnageant initial, le ratio sucres/protéines est réduit de 50% pour 90% de saturation en SAm, avec un ratio de 0,65 contre 1,4 pour le surnageant initial. Cette valeur résulte à la fois

de la hausse de la concentration protéique ainsi que de l'élimination d'une partie des sucres qui restent solubles. La répartition des masses molaires des protéines précipitées à 90 % en SAM montre la présence de protéines à hauts poids moléculaires (Figure 37). Celles dont le poids moléculaire est inférieur 10 kDa sont quasiment inexistantes. Cette absence des peptides et des acides aminés du profil CES des protéines précipitées par le SAM en comparaison au surnageant pourrait être une conséquence du dessalage. En effet, après précipitation et centrifugation, le culot protéique est remis en solution dans de l'eau mais il est nécessaire d'éliminer le sulfate d'ammonium résiduel et de concentrer la solution protéique. Pour cela, une cellule Amicon a été utilisée avec une membrane présentant un seuil de coupure de 1 kDa. Ainsi, les petites molécules protéiques ont pu passer au travers et se retrouver diluées dans l'eau de lavage.

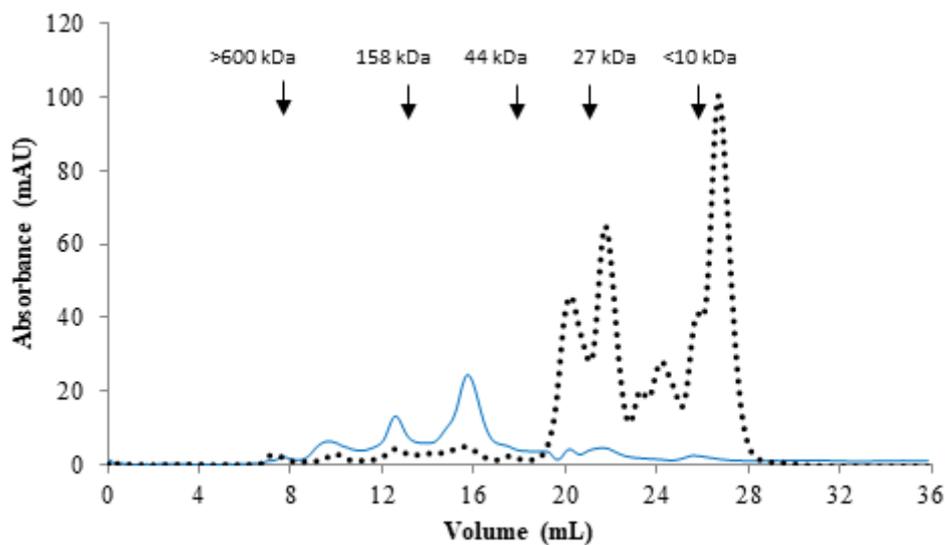


Figure 37 Profils CES des protéines du surnageant de broyage initial (...) et des protéines précipitées par le sulfate d'ammonium à 90 % de saturation (courbe bleue). Les poids moléculaires indiqués par des flèches correspondent aux marqueurs de taille utilisés pour la calibration de la colonne. Colonne superdex 200, gamme de résolution entre 10 et 600 kDa.

La précipitation protéique par le sulfate d'ammonium a permis de séparer une partie des sucres et les protéines extraites lors du broyage de HPV. En parallèle, cette méthode a conduit au fractionnement des protéines en permettant la récupération des protéines de haut poids moléculaire dont les propriétés émulsifiantes ont été évaluées.

La CE des protéines issues de la précipitation au sulfate d'ammonium à 90 % de saturation est estimée à 451 ± 30 contre 558 ± 7 mL/g pour le surnageant à pH initial. La différence de CE est une conséquence de l'absence des petites protéines dans le mélange après leur précipitation

par le SAM et leur lavage. Ces petites molécules protéiques sont désignées dans la littérature comme des « boosters » d'émulsion. Leur absence participe à réduire la capacité des protéines à émulsionner plus d'huile. Cependant nous ne pouvons conclure quant à l'influence des glucides hydrosolubles sur les propriétés émulsifiantes des protéines extraites de HPV. Par ailleurs, la diminution de la quantité de sucres n'affecte pas la stabilité des émulsions obtenues à partir des protéines de HPV. La SE de l'émulsion préparée à partir des protéines précipitées par le sulfate d'ammonium est similaire à celle du surnageant initial bien que le ratio sucres/protéines soit deux fois moins élevé après la purification des protéines.

La précipitation au sulfate d'ammonium a permis de concentrer et de purifier partiellement l'extrait protéique obtenu après broyage. Diminuer la teneur en glucides hydrosolubles et isoler les protéines de haut poids moléculaires issues du surnageant n'ont pas significativement amélioré leurs propriétés fonctionnelles. En considérant l'opération unitaire supplémentaire que nécessite la précipitation au sulfate d'ammonium et le dessalage de la solution alors qu'il n'accroît pas les propriétés émulsifiantes, l'utilisation de la matrice globale qu'est le surnageant comme agent émulsifiant serait plus pertinente.

5. Conclusion partielle

En conclusion de cette partie nous rappellerons que malgré la rigidité de la paroi cellulaire de *H. pluvialis*, le broyage mécanique a permis d'extraire les protéines. Un broyage à haute pression, associé à une variation de pH (de natif à neutre) améliore le rendement d'extraction des protéines de + 10 %. La caractérisation de cette fraction d'intérêt montre une large distribution de masses molaires. La courbe de solubilité révèle qu'à chaque pH un certain pourcentage de protéines précipite, ce qui sous entend qu'il y a plusieurs grandes familles de protéines. Cependant, la grande majorité des protéines a un point isoélectrique autour d'un pH = 6.

En ce qui concerne les essais de fractionnement et de concentration des protéines, la technique membranaire semble être la plus adaptée. En effet, si cette méthode ne permet pas de séparer les protéines des autres molécules, elle conduit en revanche à une concentration des protéines et un enrichissement en protéines de hauts poids moléculaires. La précipitation au sulfate d'ammonium quant à elle, permet une purification partielle de la fraction protéique, mais sa mise en œuvre semble peu envisageable au niveau industriel. Enfin, la précipitation acide a également été écartée car elle semble dénaturer les protéines.

L'évaluation du potentiel des extraits protéiques de HPV et de leurs dérivés (rétentats, perméats) en tant qu'agent émulsifiant nous révèle qu'ils ont un fort potentiel. Leur capacité émulsifiante (CE) bien que plus faible que celle de la référence (caséinate de sodium), reste intéressante. Les extraits protéiques, excepté le perméat, sont de meilleurs stabilisateurs d'émulsions que le caséinate. Compte-tenu des propriétés émulsifiantes des rétentats, il serait possible d'intégrer ces concentrats en l'état dans une formulation alimentaire ou cosmétique.

Les résultats présentés dans cette partie ont fait l'objet d'une publication dans Bioresource Technology en 2016 et présentée en annexe.

Partie 3 Fractionnement de la matrice hydrosoluble extraite de H. pluvialis rouge et valorisation en tant qu'agent émulsifiant

Après l'extraction des composés d'intérêts par broyage haute pression, nous nous intéressons à la fraction aqueuse de HPR : le surnageant de broyage (SBr). Ce dernier, à l'instar du surnageant de la forme verte, est une matrice complexe contenant à la fois des lipides, des protéines, des pigments et des sucres. Cependant, à la différence de la forme verte, le surnageant est riche en caroténoïdes et probablement en astaxanthine. De ce fait, il est nécessaire de les séparer du reste des composés. Pour cela, un polymère cationique (le PEI) a été testé pour la première fois sur un extrait de microalgues. Une partie des résultats de cette section ont été obtenus dans le cadre du stage de Master 2 d'Alexandrine Foissard (janvier à juin 2015).

1. Fractionnement du surnageant de *H. pluvialis* Rouge (HPR)

Comme détaillé dans la synthèse bibliographique (paragraphe 5.2.2), le polyéthylèneimine (PEI) a été décrit comme permettant la purification des protéines solubles issues de broyats de *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas putida*, en permettant en particulier la précipitation des acides nucléiques, mais également la floculation de lipides et de débris cellulaires (Milburn *et al.*, 1990; Salt *et al.*, 1995; 1996). Ce polymère cationique est un agent flocculant dont l'action est influencée par les variations de forces ioniques et de pH. En effet, le mécanisme d'action repose sur des interactions entre les molécules à éliminer et les charges positives portées par le polymère. D'autres paramètres doivent cependant être pris en compte comme le pourcentage de PEI ajouté et la dilution éventuelle de l'échantillon, ces deux paramètres servant à ajuster le ratio PEI/échantillon. Par ailleurs, une pré-clarification par ajout de Borax (tétraborate de sodium) peut permettre d'obtenir un taux de purification supérieur, en éliminant en particulier certains sucres solubles. Néanmoins, les travaux de Salt *et al.* (1995, 1996) ont montré que ces paramètres doivent être ajustés « au cas par cas », puisque les conditions optimales de purification sont différentes d'un extrait à l'autre. Néanmoins, différents paramètres « de base » ont été tirés de la bibliographie : un mélange volume/volume PEI/échantillon, une solution de PEI entre 0,025 et 0,125 %, un pH de 7,4 et une concentration en NaCl entre 0 et 1M.

En ce qui concerne le surnageant de la forme rouge (SBr) de HPR, une première étape de dilution est mise en œuvre. En effet, le SBr pur étant très chargé (environ 12 g de MS/L de SBr), il est nécessaire d'étudier l'impact de la dilution de l'échantillon de SBr. Dans un second

temps, l'influence de différents couples pH/pourcentage de PEI sur l'efficacité de fractionnement est évalué. Par la suite, l'influence de la variation de la force ionique est déterminée en utilisant du NaCl. Enfin, l'intérêt d'une pré-clarification au Borax est vérifié. L'efficacité de la méthode de fractionnement au PEI est évaluée sur le surnageant de floculation en mesurant la turbidité à 750 nm (traduit la présence de lipides et de pigments dans le surnageant) et en dosant les protéines et les sucres.

1.1. Effet de la dilution du surnageant SBr

Le SBr est dilué avec de l'eau selon un facteur choisi, puis mélangé volume/volume avec une solution à 0,075 % de PEI ou avec de l'eau afin d'évaluer l'impact du ratio PEI/échantillon. La dilution du SBr avec de l'eau montre que la turbidité décroît proportionnellement à la dilution (Figure 38). Le taux de protéines a été déterminé par dosage colorimétrique puis exprimé en fonction de la MS propre à chaque dilution. Dans tous les cas, les protéines représentent environ 30 % de la MS du surnageant, ce qui montre que la dilution avec de l'eau n'a donc pas d'impact sur la répartition des protéines. Cependant, afin de pouvoir comparer plus facilement les résultats, ceux-ci seront par la suite exprimés en « % de protéines conservées », c'est-à-dire le rapport entre la quantité de protéines après floculation par rapport à la quantité initiale.

La même expérience, effectuée en ajoutant 0,075 % de PEI, montre tout d'abord l'effet de ce polymère en comparaison au témoin (sans PEI) avec la dilution 1 (surnageant non dilué). En effet, la turbidité est 10 fois moins élevée en présence de PEI et le taux de protéines conservées dans le surnageant passe de 100 à 50 %. Lors des premières dilutions (5/6, 2/3 et 1/2), la turbidité est encore plus faible que celui du témoin. Elle passe de 0,14 sans dilution à 0,04 pour la dilution 5/6 et 0,03 pour les dilutions 2/3 et 1/2. Mais les taux de protéines dans ces dilutions restent stables par rapport à la dilution 1 (~50 %). Pour les surnageants les plus dilués (1/3 et 1/6), on observe un taux de protéines supérieur au taux du témoin, respectivement 150 % et 230 %. Ces résultats laissent supposer que la teneur en protéines est surestimée dans ces échantillons. Cette surestimation a été attribuée à la présence de PEI résiduel dans le surnageant qui entraîne une interférence lors du dosage des protéines par la méthode de Lowry. Cette interférence a lieu même pour de faibles concentrations du polymère floculant (Gupta *et al.*, 2000). Pour ces deux dilutions, le surnageant de broyage est donc trop dilué.

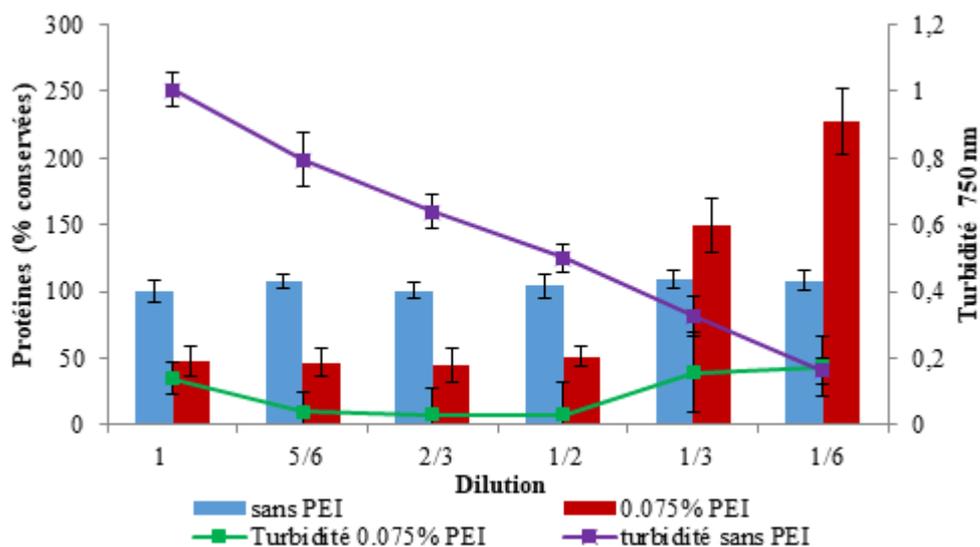


Figure 38 Influence de la dilution sur la turbidité mesurée à 750 nm (courbe violette, surnageant non traité ; courbe verte, surnageant traité avec 0,075% de PEI) et sur la répartition des protéines dans le surnageant avec ou sans PEI à 0,075% (barres bleues, surnageant non traité ; barres rouges, surnageant traité avec 0,075% de PEI ; valeurs exprimées en % de protéines conservées par rapport au surnageant avant traitement). Les résultats correspondent à la moyenne d'au moins 3 répétitions et les barres d'erreur correspondent aux écarts-types.

Par la suite, les travaux sont menés sur les dilutions $\frac{1}{2}$ et/ou $\frac{2}{3}$. Ces deux dilutions ont été choisies parce qu'elles correspondent à un échantillon de surnageant avec une turbidité presque nulle (Figure 39). En outre, les taux de protéines non flocculées sont intéressants, on en conserve ~50 % dans le surnageant.

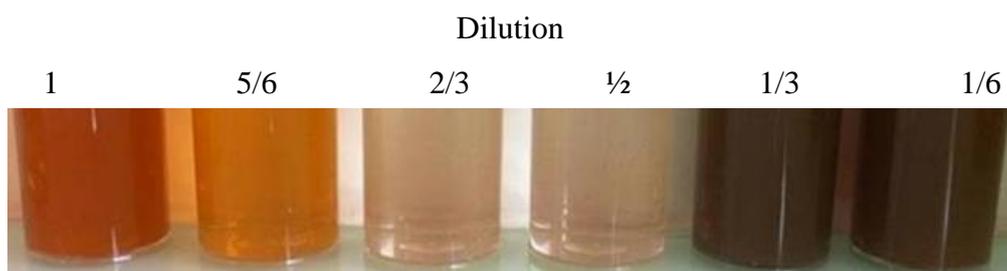


Figure 39 Surnageants de HPR témoin et à différentes dilutions avec une solution de PEI à 0,075 %.

1.2. Effet du pH sur la flocculation au PEI

Dans un second temps, l'influence de la concentration en PEI (entre 0 et 0,125 %) ainsi que du pH a été évaluée. Quatre pH ont été testés : 6,3 qui est le pH natif du surnageant de broyage, 7,4, qui est le pH optimal pour *S. cerevisiae*, 8,5 et 10. L'objectif est de modifier la charge des

molécules à éliminer et donc leur interaction avec le PEI. Ces essais ont été réalisés pour une dilution au 1/2 du surnageant.

A pH initial (6,3, Figure 40) la turbidité du surnageant diminue de 0,5 uA à 0,06 uA pour 0,025 % de PEI. Puis elle remonte jusqu'à atteindre le niveau du témoin pour une quantité de PEI supérieure ou égale à 0,075 %. Le même schéma est observé pour le taux de protéines qui passe de 3 % MS dans le témoin sans PEI, à 12 % MS pour 0,025 % PEI puis à 18 % MS pour 0,05 % PEI, pour enfin remonter au niveau du témoin. Les pertes protéiques atteignent donc leur maximum de 65 % à 0,025 % de PEI (Figure 40). Etant donné que la turbidité est aussi au plus bas à cette condition, il est probable que les protéines soient flocculées avec les pigments. A pH initial et à partir de 0,075 % de PEI, on conserve l'intégralité des protéines mais la turbidité est encore élevée ce qui laisse supposer que les pigments sont aussi présents.

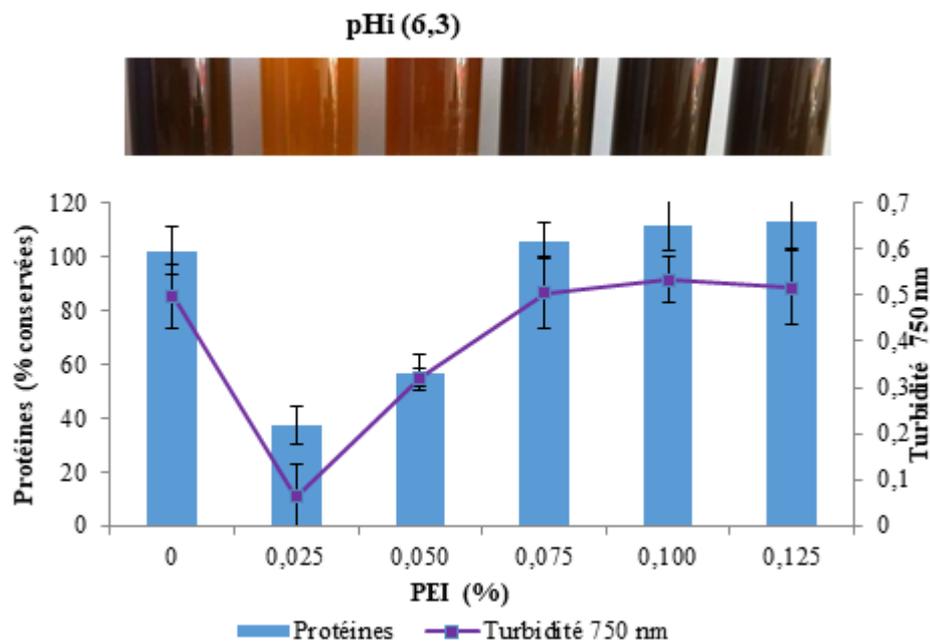


Figure 40 Influence de la concentration en PEI sur le pourcentage de protéines conservées (histogrammes bleus) et la turbidité (courbe violette) du surnageant à pH initial (6,3) Les résultats correspondent à la moyenne d'au moins 3 répétitions et les barres d'erreur correspondent aux écarts-types.

A pH 7,4 (Figure 41), l'ajout de seulement 0,025 % de PEI entraîne une chute de la turbidité de 0,5 uA à 0,001 uA. Elle augmente ensuite jusqu'à atteindre la valeur maximale de 0,14 uA à 0,075 % et 0,100 % de PEI. Le taux de protéines suit sensiblement la même tendance. On en perd environ 60 % dès l'ajout de 0,025 % PEI. A partir de 0,05 % de PEI, les protéines sont de

moins en moins flocculées, elles sont d'ailleurs conservées en intégralité dans le surnageant à partir de 0,100 % de PEI.

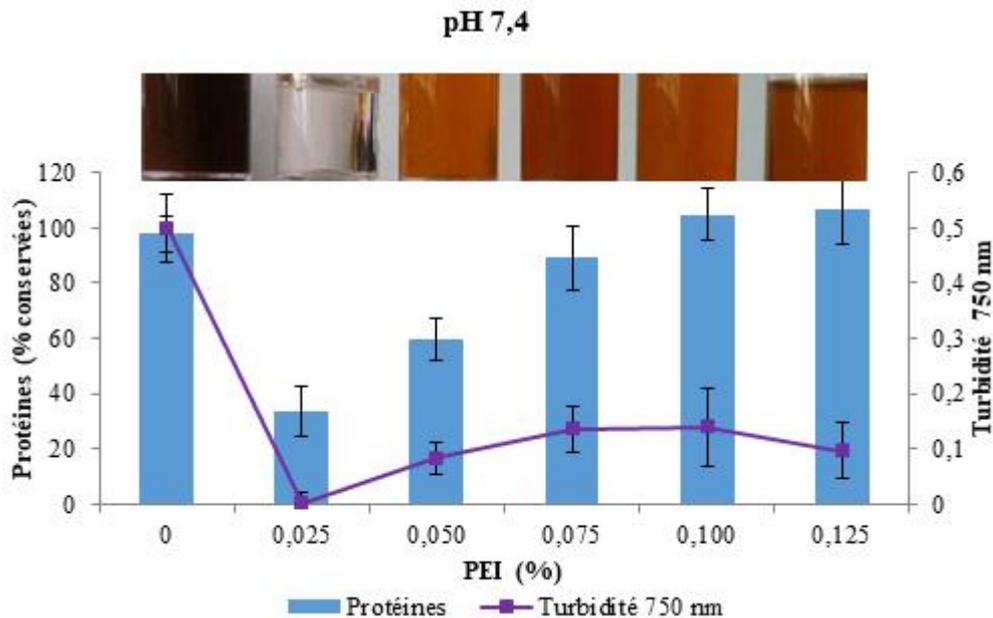


Figure 41 Influence de la concentration en PEI sur le pourcentage de protéines conservées (histogrammes bleus) et la turbidité (courbe violette) du surnageant à pH 7,4. Les résultats correspondent à la moyenne d'au moins 3 répétitions et les barres d'erreur correspondent aux écarts-types.

Les deux premiers pH expérimentés (6,3 et 7,4) ont sensiblement le même profil protéique. Les protéines sont précipitées avec le restant des composés aux faibles teneurs en PEI, puis conservées en intégralité dans le surnageant lorsque le pourcentage de PEI augmente. Il en va de même pour leur profil de turbidité, très faible à 0,025 % de PEI et en hausse au-delà. Il pourrait s'agir d'une re-solubilisation des composés non protéiques (lipides et pigments), due à un excès d'agent flocculant comme cela a été observé par Salt et al. (1995).

A pH 8,5 (Figure 42), le profil change par rapport aux autres conditions de pH. En effet, la turbidité reste stable avec l'ajout de 0,025 % de PEI. Il faudra atteindre 0,05 % de PEI pour observer une chute de la turbidité avec un minimum de 0,007 uA pour 0,100 % de PEI puis une ré-augmentation à 0,2 uA pour 0,125 % de PEI. Le taux de protéines suit sensiblement la même tendance. Elles sont conservées en totalité à 0,025 % de PEI puis 50 % sont flocculées à 0,050 et 0,075 % de PEI et enfin le pourcentage de protéines conservées remonte à 89 % au maximum de PEI.

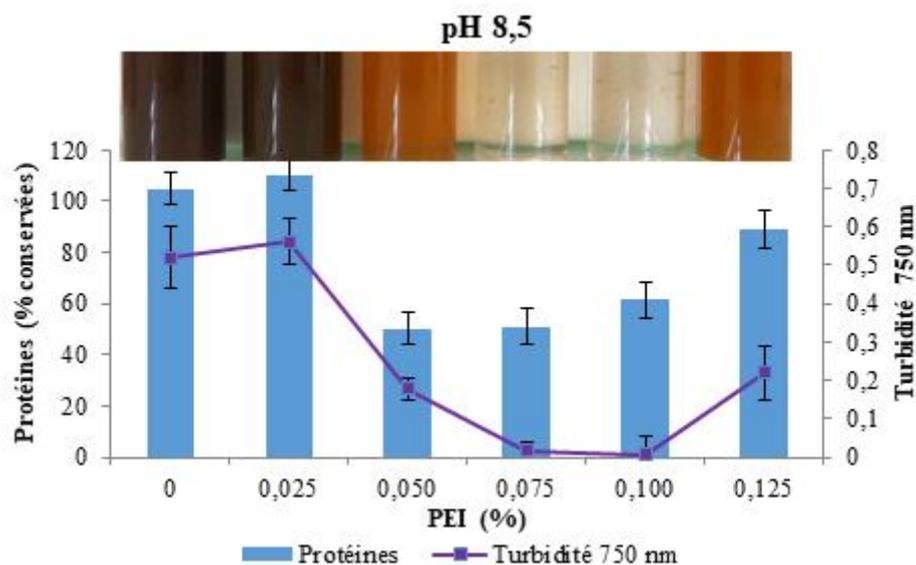


Figure 42 Influence de la concentration en PEI sur le pourcentage de protéines conservées (histogrammes bleus) et la turbidité (courbe violette) du surnageant à pH 8,5. Les résultats correspondent à la moyenne d'au moins 3 répétitions et les barres d'erreur correspondent aux écarts-types.

A pH 10 (Figure 43), la turbidité qui augmente, n'a pu être déterminée que pour les premières concentrations en PEI. En effet, après la floculation étudiée ici, une deuxième floculation entraînant presque l'intégralité des protéines a lieu et empêche d'estimer une valeur de turbidité stable. De plus, le taux de protéines observé reste relativement constant quel que soit la concentration de PEI. Dans la littérature, le pKa du groupe fonctionnel imine du PEI est donné pour être compris entre 10 et 11, mais il n'a pas été possible de trouver une valeur plus précise (Burgess, 2009). L'une des hypothèses pour expliquer les résultats obtenus à pH 10 serait donc que ce pH est trop proche du pKa de la molécule, ce qui changerait les interactions ioniques ou répulsions qu'elle peut mettre en place vis-à-vis des molécules présentes dans le SBr.

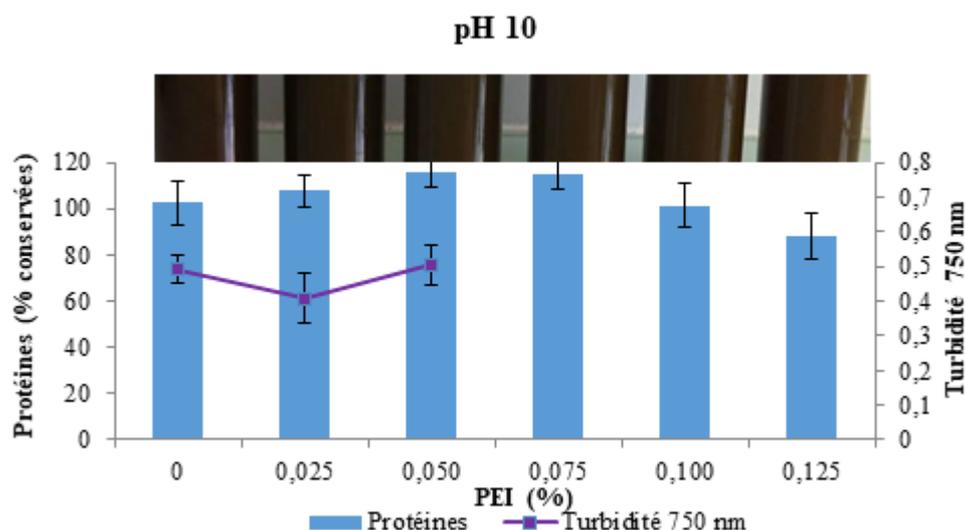


Figure 43 Influence de la concentration en PEI sur le pourcentage de protéines conservées (histogrammes bleus) et la turbidité (courbe violette) du surnageant à pH 8,5. Les résultats correspondent à la moyenne d'au moins 3 répétitions et les barres d'erreur correspondent aux écarts-types.

Les résultats obtenus à pH 10 permettent d'écarter cette condition car il semble que le PEI n'ait pas l'effet voulu. La condition de pH initial est également écartée car il y a beaucoup de protéines perdues ou une faible diminution de turbidité comparée aux autres pH testés. Ce résultat peut paraître étonnant si l'on se réfère à la courbe de solubilité des protéines établie pour la souche *H. pluvialis* verte et présentée dans la partie précédente (Figure 30, paragraphe 1 de la Partie 2 des Résultats et Discussion). En effet, il a été déterminé que les protéines de la forme verte avaient un point isoélectrique (pI) compris entre 5 et 7. A un pH proche du pI , comme c'est le cas pour le pH natif, ces protéines portent une charge globale neutre et ne devraient donc pas établir d'interactions ioniques avec le PEI. Deux hypothèses peuvent donc être proposées : soit les protéines de la forme rouge diffèrent fortement de la forme verte (avec un pI globalement plus élevé), soit les protéines perdues ont pu être « entraînés » par la floculation des lipides et pigments.

Afin de mieux comprendre les phénomènes observés, les profils de répartition des poids moléculaires des protéines ont été établis par chromatographie d'exclusion stérique pour le surnageant initial (Figure 44), ainsi que pour les surnageants de floculation.

Pour le SBr, le chromatogramme montre la présence de protéines de haut poids moléculaire, éluées dans le volume mort de la colonne en même temps que la majorité des pigments chlorophylliens et caroténoïdiens. Comme pour la forme verte, la présence d'un agrégat protéines-pigments est possible même s'il n'est pas démontré.

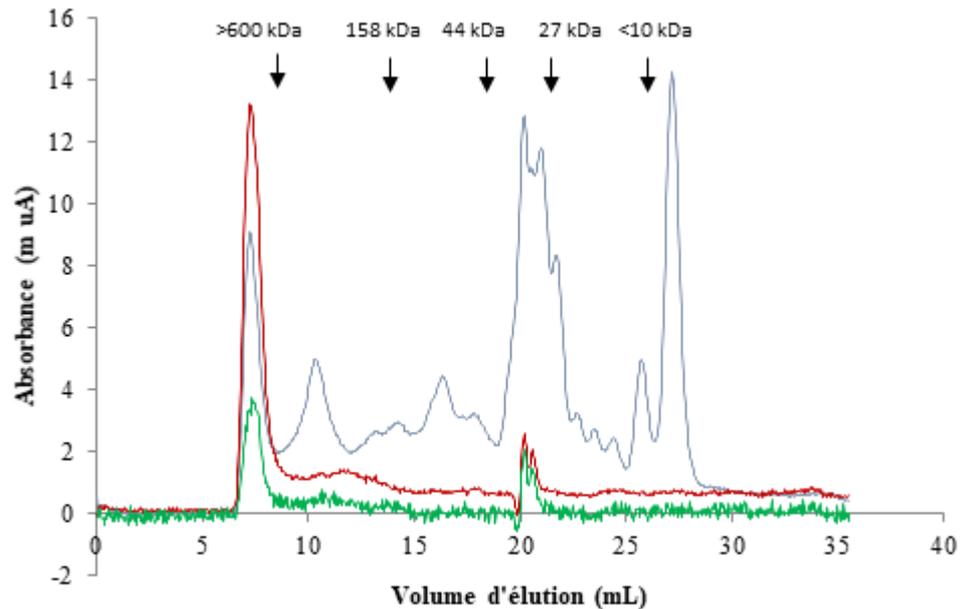


Figure 44 Profils CES des protéines solubles dans le surnageant de broyage de *H. pluvialis* rouge. Courbe verte : absorbance à 660 nm (majoritairement chlorophylles); courbe rouge : absorbance à 470 nm (majoritairement caroténoïdes), courbe bleue : absorbance à 280 nm (protéines). Les poids moléculaires indiqués par des flèches correspondent aux marqueurs de taille utilisés pour la calibration de la colonne. Colonne superdex 200, gamme de résolution entre 10 et 600 kDa.

La Figure 45 montre le profil d'élué des protéines du SBr dilué au demi et traité avec 0,025% de PEI à pH 7,4. Ces conditions de floculation avaient permis d'atteindre une turbidité très faible de 0,001 uA, ce qui est bien confirmé par le profil d'élué où aucune absorbance à 470 nm ni 660 nm n'est détectée. Cette condition entraîne également une perte de protéines de 66%. Le chromatogramme fait clairement apparaître que ce sont les protéines de haut poids moléculaire qui ont disparu. Ce résultat nous orienterait donc sur la deuxième hypothèse, à savoir que les protéines de haut poids moléculaires ont pu être « entraînés » par la floculation des lipides et pigments.

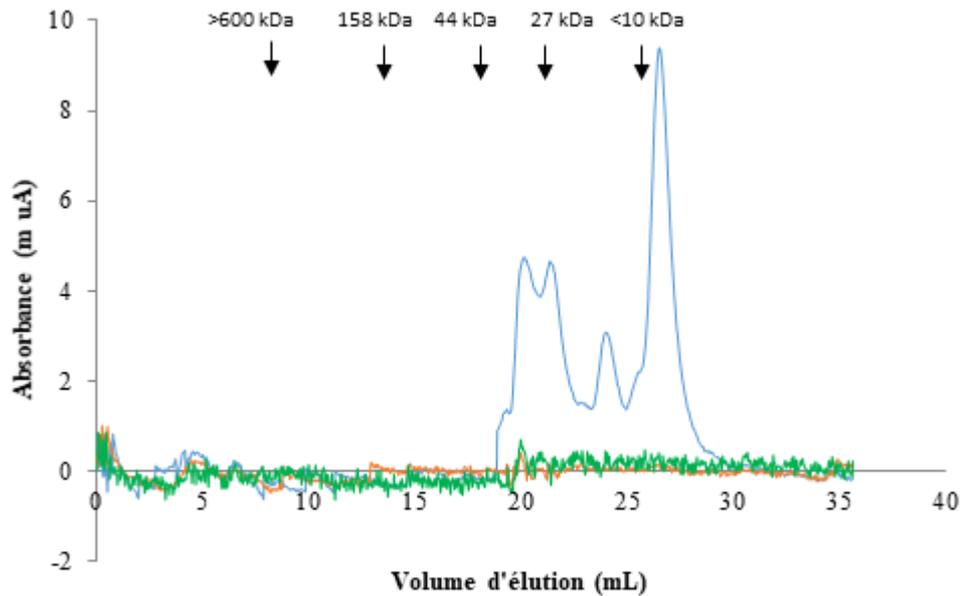


Figure 45 Profils CES des protéines conservées après traitement à 0,025% PEI du surnageant de *H. pluvialis* rouge dilué au ½ et traité à pH 7,4. Courbe verte : absorbance à 660nm (majoritairement chlorophylles); courbe rouge : absorbance à 470nm (majoritairement caroténoïdes), courbe bleue : absorbance à 280 nm (protéines). Les poids moléculaires indiqués par des flèches correspondent aux marqueurs de taille utilisés pour la calibration de la colonne. Colonne superdex 200, gamme de résolution entre 10 et 600 kDa.

Au terme de ces expérimentations, les pH 6,3 et 10 ont donc été écartés. Pour les pH 7,4 et 8,5, l'effet de la force ionique a été évalué à quelques concentrations en PEI.

1.3. Effet de la force ionique

Le PEI étant un polymère cationique, la force ionique des molécules à flocculer peut avoir un effet sur son efficacité. Les travaux de Salt et al. (1995) ont montré qu'en faisant varier la force ionique par ajout de chlorure de sodium (NaCl), il est possible d'influencer les mécanismes de floculation. Grâce à ce paramètre, il a minimisé la perte en protéines qui est passé de 40 % à 14 % en ajoutant 1 M de NaCl à leur broyat d'*Escherichia coli*. Burgess décrit aussi des stratégies de fractionnement par PEI qui sont en fonction de la nature des protéines (neutre, acide ou basique) et de la force ionique régulée par une concentration en NaCl (faible, intermédiaire ou élevée) (Burgess, 2009).

Différentes concentrations de sel ont été testées sur le SBr de *H. pluvialis* (Figure 46), tout d'abord en diluant le SBr au ½ à pH 7,4 et en testant plusieurs doses de PEI pré-sélectionnées.

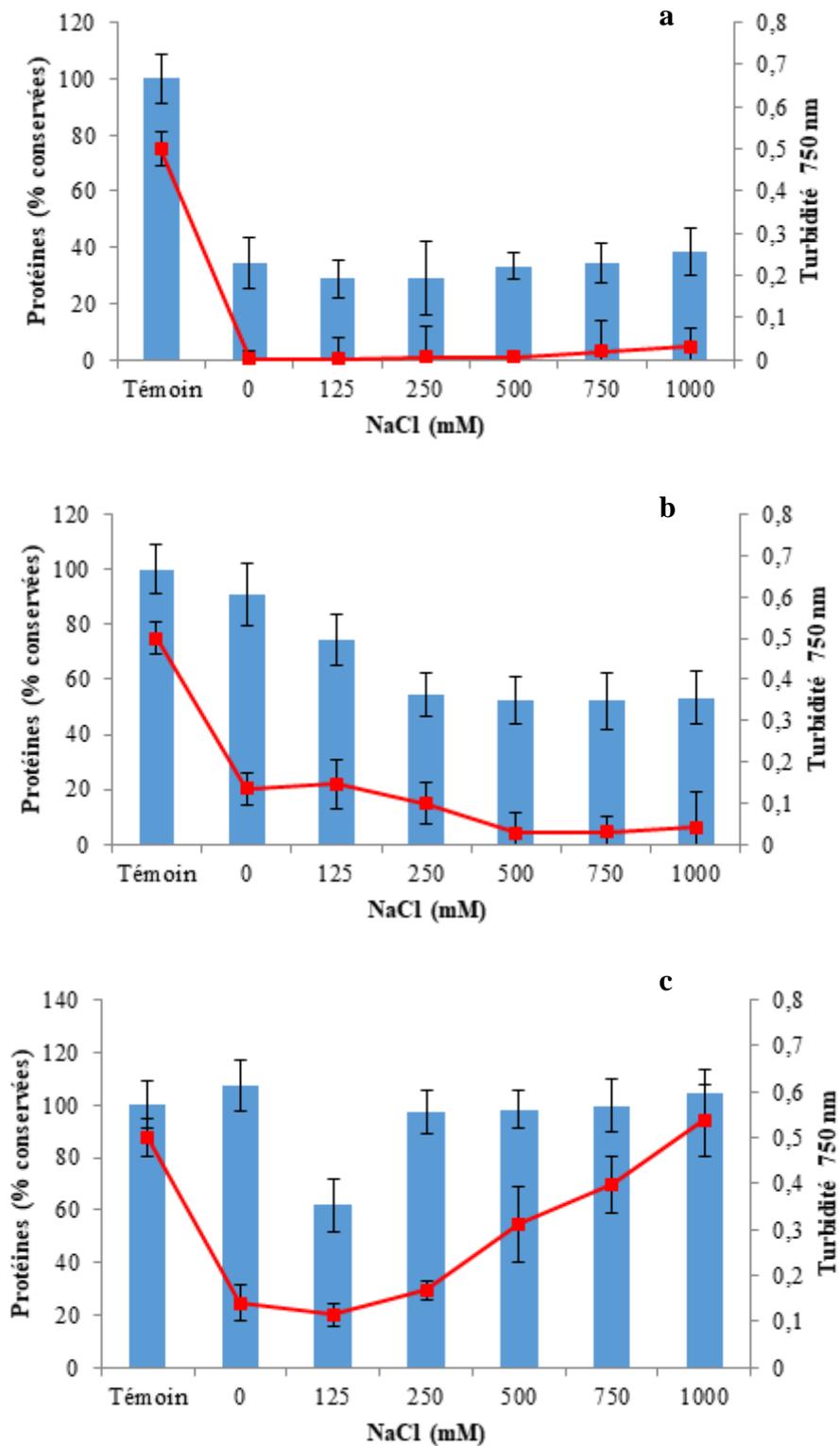


Figure 46 Influence de la teneur en NaCl (0 à 1000 mM) sur la turbidité (courbe rouge) et le pourcentage de protéines conservées (histogrammes bleus) pour des surnageants de broyage de HPR dilués au 1/2 à pH 7,4 et en présence de PEI (0,025 %, a ; 0,075 %, b et 0,100 %, c). Les résultats correspondent à la moyenne d'au moins 3 répétitions et les barres d'erreur correspondent aux écarts-types.

L'ajout de 0,025 % de PEI au surnageant fait décroître sa turbidité. Cependant l'ajout de sel ne permet pas d'éviter la floculation des protéines avec les pigments et les lipides. En effet avec ou sans sel, le PEI entraîne la perte de 70 % des protéines initiales (Figure 46 a). A 0,075 % de PEI, la turbidité diminue avec l'ajout de NaCl pour atteindre un minimum de 0,027 uA à 500 mM. L'ajout de 125 mM ne modifie pas la turbidité par rapport au PEI seul, alors que le taux de protéines conservées diminue légèrement. Pour des concentrations en NaCl supérieures, le taux de protéines conservées n'est plus que de 60 % (Figure 46 b). Enfin à 0,100 % de PEI (Figure 46 c), l'ajout de 125 mM de NaCl, permet de diminuer légèrement la turbidité (0,11 uA contre 0,14 uA pour le PEI seul) mais la perte de protéines est conséquente (62 %). Un ajout plus important de sel permet de diminuer la perte de protéines qui devient inférieure à 10 %, mais la turbidité retrouve également la même valeur que celle du témoin. A pH 7,4, l'ajout de NaCl ne permet donc pas d'améliorer l'efficacité de la floculation.

De la même façon, les essais ont été réalisés pour une dilution au 2/3 et à pH 7,4. Avec 0,075 % de PEI, aucune influence de la concentration en sel n'a été notée. A 0,100 % de PEI et une dilution du SBr au 2/3, l'ajout de NaCl permet de limiter la perte de protéines mais entraîne une turbidité élevée, qui traduit la présence importante de lipides et pigments résiduels dans le surnageant.

Précédemment, il a été montré qu'à pH 8,5 et 0,100 % de PEI, la turbidité est quasi nulle avec un taux de protéines conservées raisonnable. Cette condition a donc été testée avec une dilution du SBr de 2/3 avec 0,075 et 0,100 % de PEI (Figure 47). Pour 0,100 % de PEI, aucun effet de la concentration en NaCl n'a été observé. En revanche, pour 0,075 % de PEI, l'ajout de 125 mM de NaCl permet de conserver le même taux de protéines qu'en absence de NaCl (~50 %), mais avec une turbidité quasi nulle.

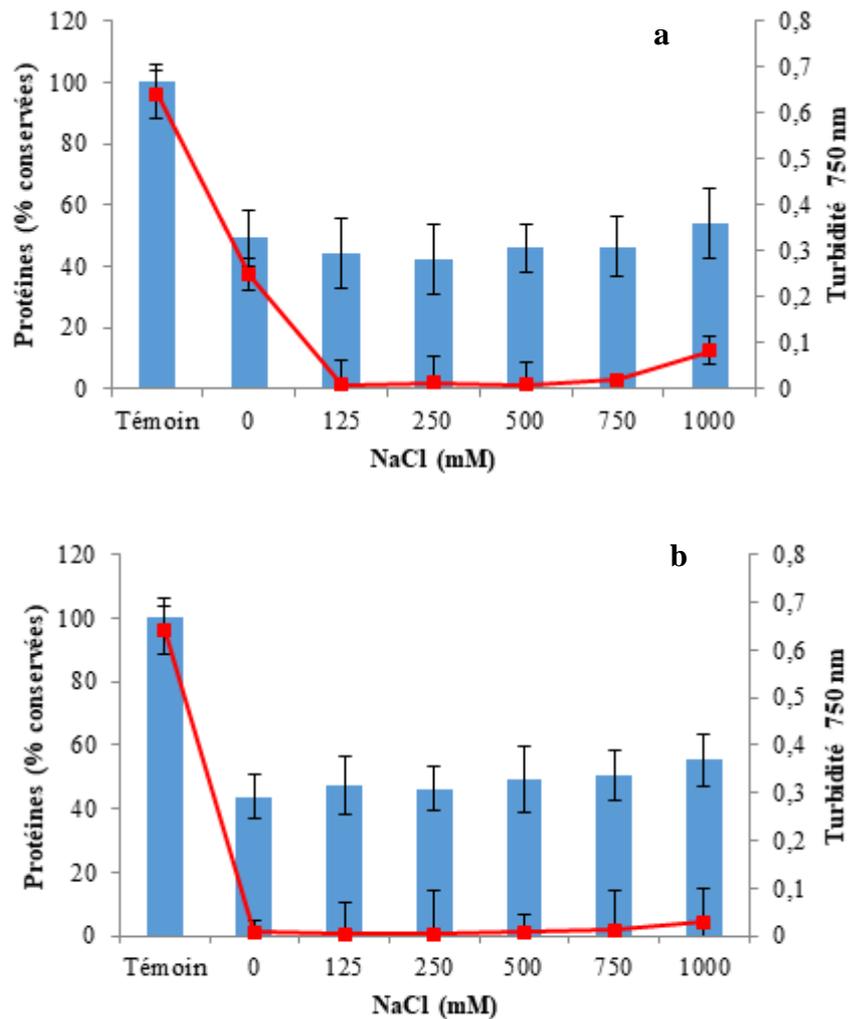


Figure 47 Influence de la teneur en NaCl (0 à 1000 mM) sur la turbidité (courbe rouge) et le pourcentage de protéines conservées (histogrammes bleus) pour des surnageants de broyage de HPR dilués au 2/3 à pH 8, 5 et en présence de 0,075 % (a) ou 0,100 % (b) de PEI. Les résultats correspondent à la moyenne d'au moins 3 répétitions et les barres d'erreur correspondent aux écarts-types.

Dans la majorité des cas testés, aucun effet positif de la présence de NaCl n'a été observé. Les seuls cas pour lesquels l'ajout de NaCl pourrait s'avérer intéressant sont à pH 7,4 dilution 1/2 avec 0,075 % de PEI et 500 mM de NaCl ou à pH 8,5, dilution 2/3, 0,075 % de PEI et 125 mM NaCl. Dans ces conditions, la turbidité est nulle, mais les taux de protéines conservées ne sont que de 52 % et de 44 % respectivement par rapport au témoin sans PEI ni NaCl. En conclusion, dans les conditions testées lors de ces travaux, la force ionique n'améliore pas le fractionnement des composés d'intérêts de SBr.

1.4. Influence de la pré-clarification au borax

Afin de réaliser une floculation sélective au PEI d'extraits de levure, Milburn et al. (1990) ont utilisé le tétraborate de sodium (borax) pour pré-clarifier leurs échantillons avant la floculation au PEI. Cette opération a pour but d'éliminer le maximum de « contaminants » (composés non-protéiques, en particulier des sucres), pour permettre au PEI de fractionner plus facilement le reste. Dans le cas du surnageant de *H. pluvialis* rouge, le borax est ajouté lors de la première dilution du SBr et l'influence de la clarification est évaluée à certaines conditions testées précédemment. De manière générale, on note que la présence de borax permet effectivement de diminuer la turbidité des surnageants dilués au 1/2 et à pH 7,4, par contre elle entraîne également une perte significative en protéines (Figure 48 a). L'influence de la teneur en NaCl a également été testée pour des concentrations en PEI de 0,075 % et 0,100 % à pH 7,4, avec les mêmes conclusions (Figure 48 b, c).

En ce qui concerne les sucres, ils ont été dosés lors de chacune des expériences présentées dans cette partie. La Figure 49 représente le pourcentage des sucres conservés dans les surnageants après action de différentes concentrations en PEI et aux 4 pH testés. Aucun effet significatif n'a été observé quelque soit la condition testée. Ce résultat est cohérent avec l'analyse des sucres présentée au paragraphe 2 de la partie 1 des Résultats et Discussion. En effet, seuls des sucres neutres ont été identifiés chez *H. pluvialis* (majoritairement du glucose) ce qui ne permet pas d'établir des interactions ioniques avec le PEI.

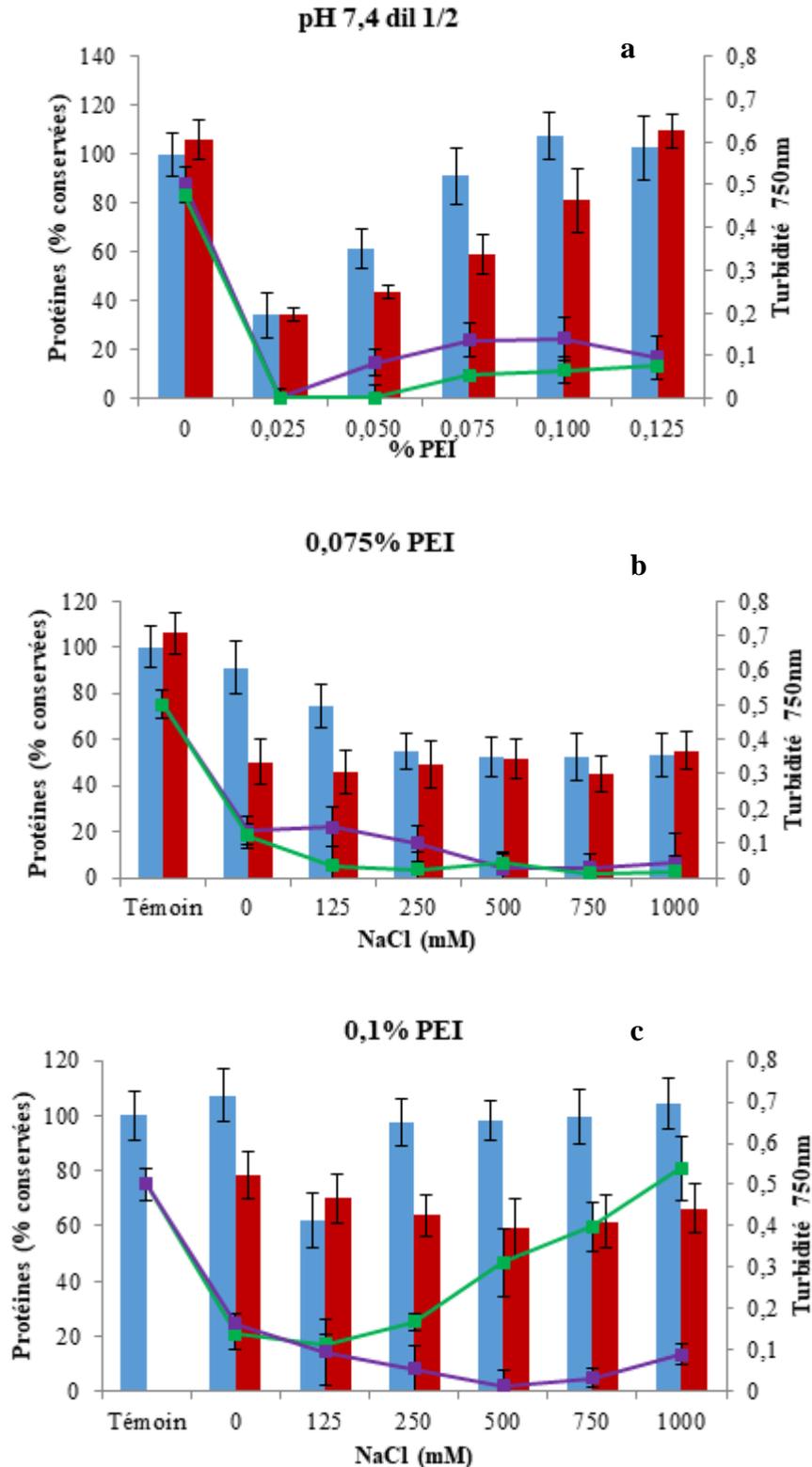


Figure 48 Influence de la pré-clarification au borax sur la teneur en protéines (histogrammes bleus : sans borax ; histogrammes rouges : avec borax) et la turbidité (courbes vertes : sans borax ; courbes violettes : avec borax) des surnageants de HPR à différents pourcentages de PEI (a) et en fonction de la concentration en NaCl (b, c) Les résultats correspondent à la moyenne d'au moins 3 répétitions et les barres d'erreur correspondent aux écarts-types.

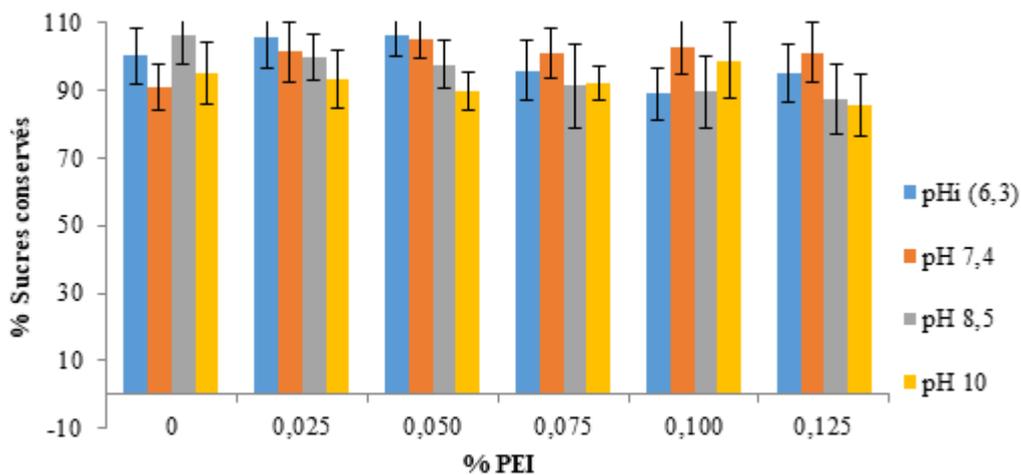


Figure 49 Influence des pourcentages de PEI et du pH sur les sucres du surnageant de broyage de *H. pluvialis* rouge. Les résultats correspondent à la moyenne d'au moins 3 répétitions et les barres d'erreur correspondent aux écarts-types.

2. Conclusion partielle

Cette partie des travaux a été réalisée dans le but de purifier les protéines des autres composés présents dans le surnageant de broyage de *H. pluvialis* rouge. La méthode choisie, jusque-là jamais utilisée sur une microalgue, met en jeu le polyéthylèneimine, un polymère cationique. Il permet la floculation des composés chargés négativement et nécessite de déterminer certains paramètres physico-chimiques qui permettraient une optimisation de la floculation. Les résultats montrent que cette méthode permet de floculer les lipides et les pigments, tout en maintenant la totalité des sucres et une part importante des protéines dans le surnageant. Plutôt qu'une méthode de purification des protéines, il s'agit donc dans notre cas d'une séparation des composés hydrosolubles et liposolubles. Contrairement aux travaux de Salt et al. (1995), la modification de la force ionique, ou l'addition de borax n'a pas permis d'améliorer le fractionnement.

L'addition successive de paramètres a permis d'envisager deux scénarios. Le premier consiste à sélectionner des conditions qui permettent d'éliminer un maximum de lipides et de pigments en sacrifiant des protéines. Ce résultat est obtenu en diluant le surnageant de broyage au demi

et en le mélangeant avec 0,100 % de PEI à pH 8,5. Ces conditions permettent d'obtenir un taux de protéines correspondant à 19 % de la matière sèche et une turbidité de 0,007 uA ce qui équivaut à une conservation de 61 % des protéines présentes initialement dans le surnageant. Le deuxième cas de figure consiste à sélectionner une condition n'éliminant pas tous les lipides et pigments mais permettant de conserver plus de protéines. C'est le cas en diluant le surnageant de broyage au demi et en le mélangeant avec 0,075 % ou 0,100 % de PEI le tout à pH 7,4. Ces conditions permettent d'obtenir un taux de conservation des protéines de 89 à 100 % avec une turbidité d'environ 0,14 uA.

Néanmoins, ces essais ont été réalisés sur des volumes de 25 mL. Il semble donc indispensable de valider les conditions de floculation retenues sur de plus gros volumes d'échantillons afin de vérifier la possibilité de montée en échelle, d'analyser de manière plus approfondie les différentes fractions, et de réaliser des tests d'émulsification sur la fraction hydrosoluble pour comparer avec les résultats obtenus précédemment sur la souche d'*H. pluvialis* verte.

3. Fractionnement et analyse des hydrosolubles/liposolubles à grande échelle et évaluation des propriétés fonctionnelles

Les 3 conditions retenues, à savoir 0,075 % et 0,100 % de PEI à pH 7,4 ainsi que 0,100 % de PEI à pH 8,5 ont été testées pour des volumes de 500 mL, ce qui correspond à un changement d'échelle x20. En terme d'analyse, comme précédemment, les sucres et protéines ont été dosées dans le surnageant et ces dernières ont été analysées par chromatographie d'exclusion stérique. En ce qui concerne les lipides et les pigments, ils ont été extraits aux solvants (chloroforme/méthanol) à la fois dans les surnageants et les culots de floculation afin de les quantifier et les analyser (chromatographie gazeuse pour les lipides, CLHP et spectrophotométrie pour les pigments). Enfin, les propriétés fonctionnelles des fractions hydrosolubles ont été étudiées (capacité émulsifiante, stabilité d'émulsion et index d'activité émulsifiante).

3.1. Caractérisation de la fraction hydrosoluble

En ce qui concerne la fraction hydrosoluble, dosée uniquement dans le surnageant de floculation, le Tableau 15 récapitule les résultats obtenus pour les 3 conditions et les compare à ceux obtenus en petits volumes.

Tableau 15 Comparaison des mesures de turbidité à 750 nm et des résultats de dosages de protéines et de sucres obtenus pour des volumes traités de 25 mL et 500 mL pour les 3 conditions retenues. Les résultats correspondent à la moyenne d'au moins 3 répétitions pour les essais réalisés sur des volumes de 25 mL et 1 répétition pour l'essai réalisé sur un volume de 500 mL. Les dosages ont été réalisés en triplicat pour chaque expérience indépendante.

	0,075% PEI, pH 7,4		0,100% PEI, pH 7,4		0,100% PEI, pH 8,5	
	25 mL	500mL	25 mL	500mL	25 mL	500mL
Protéines (% conservées)	89,1 ± 4,9%	89,8% ± 3,3%	104,9 ± 13,3%	89,60% ± 4,1%	61,3 ± 7,5%	61,20% ± 3,7%
Sucres (% conservés)	101,0 ± 7,5%	99,0% ± 1,1%	103,0 ± 8,3%	94% ± 3,5%	89,5 ± 10,8%	101% ± 2,4%
Turbidité 750 nm (uA)	0,135 ± 0,04	0,141 ± 0,01	0,14 ± 0,07	0,17 ± 0,01	0,007 ± 0,05	0,006 ± 0,01

En ce qui concerne les protéines, les résultats obtenus pour 0,075 % de PEI à pH 7,4 et 0,100 % à pH 8,5 sont cohérents avec ceux précédemment obtenus pour des volumes de 25 mL puisque 89,8 % de protéines sont conservées dans le surnageant à pH 7,4 (contre 89,1 ± 4,9 % précédemment) et 61,2 % à pH 8,5 (contre 61,3 ± 7,5 % pour des volumes de 25 mL). En revanche, la condition à pH 7,4 et 0,100 % de PEI, qui était la plus favorable au maintien des protéines dans le surnageant (104,9 ± 13,3 %) s'est avérée décevante sur des volumes de 500 mL puisque 89,6 % des protéines seulement sont conservées dans le surnageant, valeur équivalente à ce que l'on obtient pour 0,075 % de PEI. Il est à noter que lors des essais préliminaires, les résultats des répétitions pour cette concentration en PEI étaient très hétérogènes. Cinq essais avaient été réalisés, avec des taux de protéines conservées compris entre 75,8 et 117,0 %. Au vu de ces résultats, cette condition est écartée, et le reste des analyses est réalisé uniquement sur les échantillons obtenus avec 0,075 % de PEI à pH 7,4 et 0,100 % à pH 8,5.

Les profils de poids moléculaires des protéines ont été analysés par chromatographie d'exclusion stérique. La Figure 50 montre la répartition de poids moléculaires des protéines du surnageant de broyage (Figure 50 a), du surnageant de floculation obtenu avec 0,075 % de PEI à pH 7,4 (Figure 50 b) et du surnageant de floculation obtenu avec 0,100 % de PEI à pH 8,5 (Figure 50 c). Les résultats montrent que pour le surnageant obtenu à pH 7,4, l'absorbance à 660 nm est nulle sur toute la durée de l'élution, alors qu'un pic d'intensité importante était observé pour le surnageant de broyage. Ceci indique que les chlorophylles, qui absorbent

fortement à 660 nm, sont absentes du surnageant après floculation. En ce qui concerne les caroténoïdes, qui peuvent être suivis par l'absorbance à 470 nm, le pic majoritaire a disparu mais il subsiste un pic de faible intensité entre 10 et 15 mL d'élution. Ceci est en accord avec le résultat de turbidité obtenus sur cet échantillon, qui est de 0,14 uA, et qui traduit la présence résiduelle de pigments. Pour les protéines, ce sont majoritairement des protéines de haut poids moléculaire qui ont disparu, même si une partie d'entre elles ont été conservées. Pour le surnageant obtenu à pH 8,5, la turbidité était très faible (0,007 uA), ce qui est en accord avec les suivis d'absorbance à 660 et 470 nm qui sont nuls sur toute la durée de l'élution. En ce qui concerne les profils de protéines, encore une fois, ce sont majoritairement des protéines de haut poids moléculaire qui ont disparu, mais également une fraction d'environ 30 kDa.

3.2.Caractérisation de la fraction liposoluble

La fraction liposoluble a été analysée à la fois dans le surnageant et le culot de floculation, afin de quantifier et caractériser les lipides et les pigments présents.

La première étape a donc consisté à extraire les lipides et pigments par la méthode de Bligh et Dyer modifiée et décrite au paragraphe 3.2.1.3 de la section Matériels et Méthodes. Cette méthode gravimétrique permet de quantifier la totalité de la fraction liposoluble. Au niveau du surnageant de broyage, les lipides et pigments représentent 45 % de la matière sèche du surnageant. Pour les culots de floculation obtenus avec 0,075 % de PEI à pH 7,4, et 0,100 % de PEI à pH 8,5, les fractions liposolubles extraites représentent respectivement 42 % et 43 % de la matière sèche initiale du surnageant de broyage, ce qui correspond à 94 et 96 % des lipides initialement présents dans le surnageant de broyage. Ce résultat montre à la fois que le PEI permet une floculation efficace des lipides, mais également que l'interaction est réversible puisque près de 100 % des lipides ont ensuite pu être récupérés. Pour les surnageants de floculation, l'application directe de l'extraction de Bligh et Dyer n'a pas permis la quantification de la fraction liposoluble car la méthode gravimétrique est peu adaptée aux échantillons dilués. Un aliquot a donc été lyophilisé, puis la fraction liposoluble extraite selon la même méthode. Néanmoins, il n'a pas non plus été possible de quantifier la fraction liposoluble, les quantités de lipides et pigments résiduels dans les surnageants étant trop faibles. Cependant, le surnageant de floculation obtenu pour 0,075 % de PEI à pH 7,4 présentait une coloration visible et une turbidité mesurée de 0,14 uA.

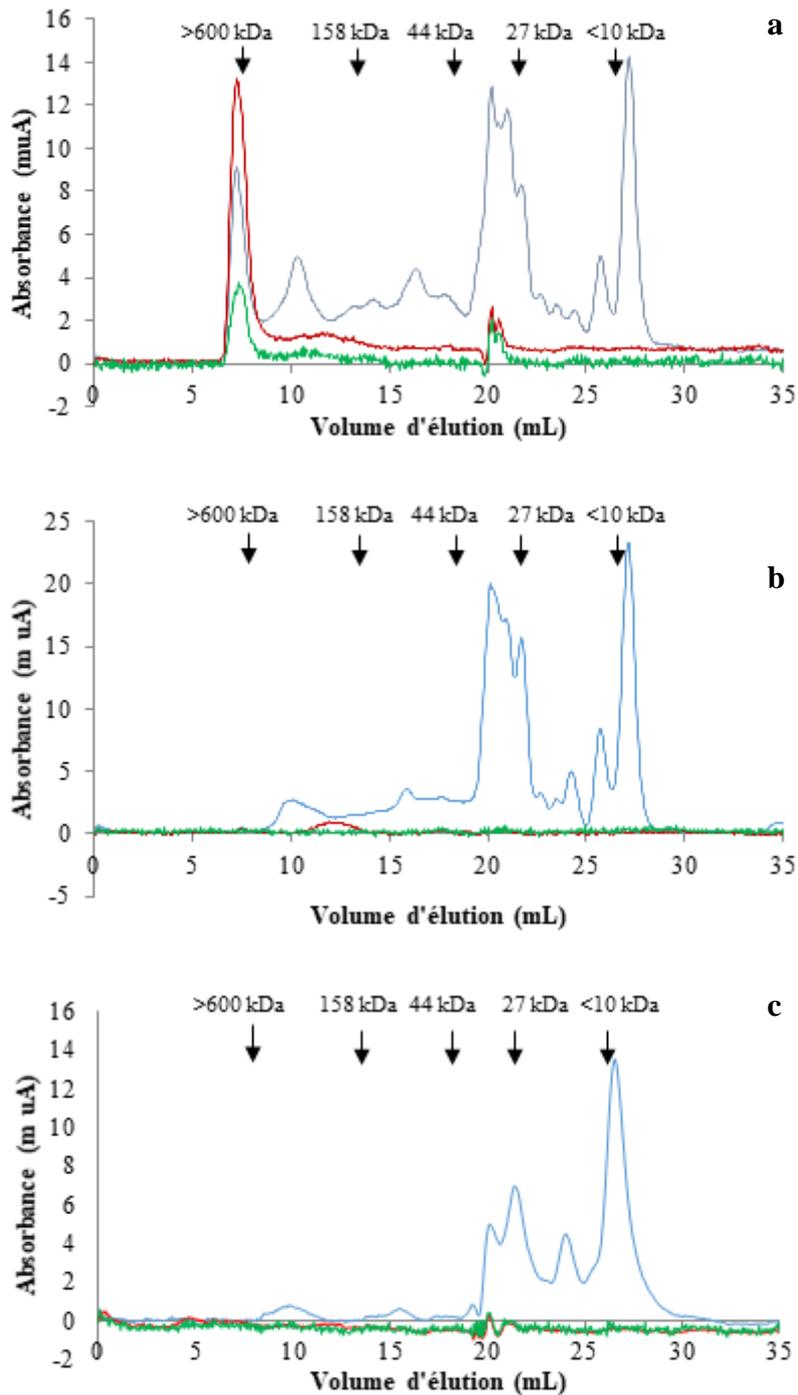


Figure 50 Profils d'élution en chromatographie d'exclusion stérique du surnageant de broyage (a), du surnageant de floculation obtenu avec 0,075 % de PEI à pH 7,4 (b) et du surnageant de floculation obtenu avec 0,100% de PEI à pH 8,5 (c). Courbe verte : absorbance à 660 nm (majoritairement chlorophylles); courbe rouge : absorbance à 470 nm (majoritairement caroténoïdes), courbe bleue : absorbance à 280 nm (protéines). Les poids moléculaires indiqués par des flèches correspondent aux marqueurs de taille utilisés pour la calibration de la colonne. Colonne superdex 200, gamme de résolution entre 10 et 600 kDa.

A partir des surnageants lyophilisés, une extraction à l'acétone a donc été mise en œuvre afin de réaliser une quantification au spectrophotomètre (Tableau 16) selon la formule de Lichtenthaler et Buschmann (2001) et comme décrit au paragraphe 3.3.1 de la section Matériels et Méthodes. Cette quantification a également été réalisée pour le surnageant de broyage initial, ainsi que pour les culots de floculation (Tableau 16).

Tableau 16 Quantification des chlorophylles *a*, *b* et caroténoïdes au spectrophotomètre selon la méthode Lichtenthaler et Buschmann (2001). Les résultats correspondent à la moyenne de 3 extractions de pigments indépendantes. Les pourcentages indiquent la répartition chlorophylles/caroténoïdes parmi les pigments analysés.

	mg/g MSinitiale			
	Chlorophylle <i>a</i> (Ca)	Chlorophylle <i>b</i> (Cb)	Chlorophylles totales (Ca+b)	Caroténoïdes totaux (Cx+c)
Surnageant de broyage (SBr)	4,60 ± 0,06	3,55 ± 0,06	8,15 ± 0,13 33 %	16,82 ± 0,32 67 %
Culot de floculation (0,075 %, pH 7,4)	5,18 ± 0,11	4,24 ± 0,09	9,42 ± 0,20 37 %	15,91 ± 0,18 63 %
Culot de floculation (0,100 %, pH 8,5)	5,08 ± 0,17	4,06 ± 0,12	9,14 ± 0,30 34 %	17,79 ± 0,21 66 %
Surnageant de floculation (0,075 %, pH 7,4)	-	-	- 0 %	0,34 ± 0,08 100 %
Surnageant de floculation (0,100 %, pH 8,5)	-	-	- 0 %	- 0 %

L'analyse du surnageant de broyage montre une répartition à 33 % de chlorophylles et 67 % de caroténoïdes totaux. Pour les pigments extraits des culots de floculation, les répartitions sont similaires avec 37 % et 63 % dans le cas d'une floculation avec 0,075 % de PEI à pH 7,4 et 34 % et 66 % dans le cas d'une floculation avec 0,100 % de PEI à pH 8,5. En ce qui concerne le surnageant de floculation obtenu pour 0,100 % de PEI à pH 8,5, les quantités de pigments étaient trop faibles pour être quantifiées par cette méthode. Pour le surnageant de floculation obtenu pour 0,075 % de PEI à pH 7,4, aucune chlorophylle n'a été détectée, mais un faible taux de caroténoïdes a été mis en évidence (0,34 ± 0,08 mg/g MS initiale). Ces résultats semblent cohérents avec les turbidités mesurées précédemment et qui montraient une valeur plus élevée

pour cette deuxième condition de floculation. En revanche, ce dosage met évidence le fait que les pigments résiduels sont des caroténoïdes, et même si le taux est faible, il est important de savoir de quel type il s'agit. Une méthode d'analyse par CLHP a donc été mise au point afin d'identifier les pigments présents dans le surnageant de broyage, ainsi que dans les surnageants et culots de floculation. La méthode a été développée à partir de la publication de Yuan et al. (1997). Un certain nombre de standards ont été injectés (astaxanthine libre, chlorophylle *a*, chlorophylle *b*, lutéine, β -carotène), les autres pics ont été identifiés par analogie (ordre d'éluion) avec la publication de référence. Cette méthode n'est donc actuellement pas quantitative, mais uniquement qualitative. Le spectre CLHP du surnageant de broyage (Figure 51 a) fait apparaître un nombre très important de pics, correspondant aux standards injectés, mais également à de la cantaxanthine et à différents niveaux d'estérification de l'astaxanthine. Les spectres obtenus à partir des culots de floculation (Figure 51 b, c) présentent des profils non totalement superposables mais très similaires. Pour le surnageant de floculation obtenu pour 0,075 % de PEI à pH 7,4, un pic d'astaxanthine estérifiée de très faible intensité est visible, mais le pic majoritaire correspond à du β -carotène. On peut donc conclure que les pigments résiduels dans le surnageant de floculation sont des caroténoïdes, et plus spécifiquement du β -carotène.

La répartition des acides gras constitutifs des lipides présents dans le surnageant de broyage et dans les culots de floculation a été analysée par chromatographie en phase gazeuse comme présenté au paragraphe 3.2.2 du Matériels et méthodes. La Figure 52 présente une comparaison des spectres obtenus pour le SBr et le culot de floculation obtenu avec 0,075 % de PEI à pH 7,4. Les résultats quantitatifs de l'analyse sont présentés dans le Tableau 17

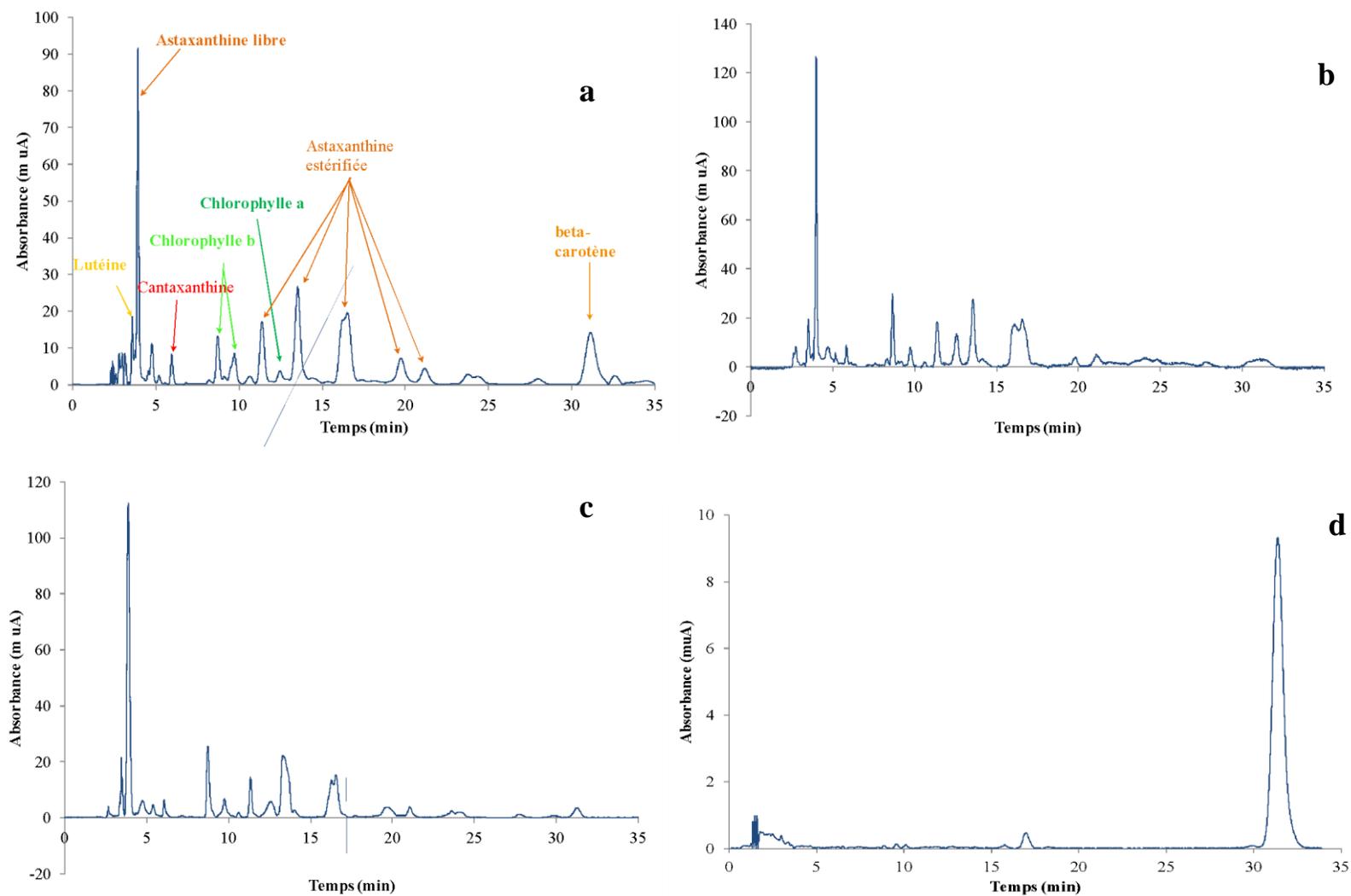


Figure 51 Spectres CLHP du surnageant de broyage (a), du culot de floculation obtenu pour 0,075 % de PEI à pH 7,4 (b), du culot de floculation obtenu pour 0,100 % de PEI à pH 8,5 (c), et du surnageant de floculation obtenu pour 0,075 % de PEI à pH 7,4 (d).

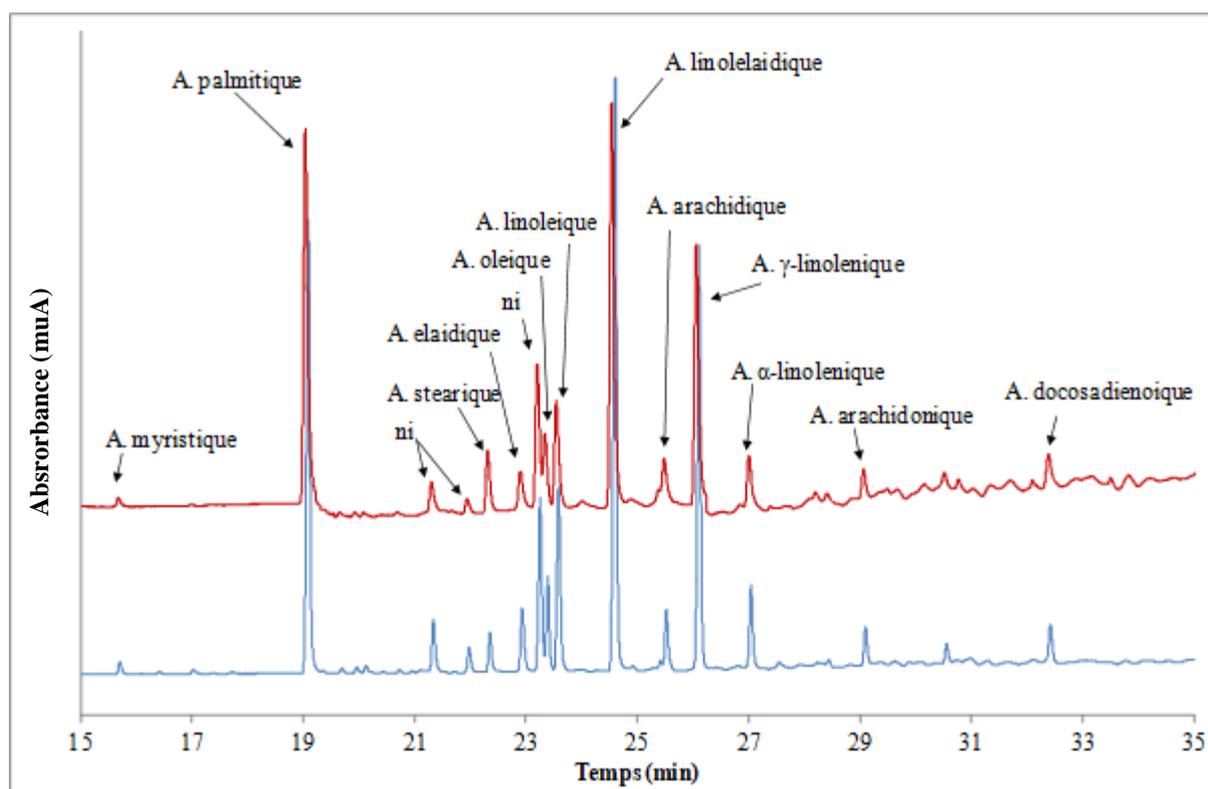


Figure 52 Profils de répartition des acides gras analysés en chromatographie en phase gazeuse pour les lipides extraits du surnageant de broyage (bleu) et du culot de floculation obtenu pour 0,075 % de PEI à pH 7,5 (rouge). ni : non identifié.

Tableau 17 Répartition des acides gras analysés en chromatographie en phase gazeuse pour les lipides extraits du surnageant de broyage et des culots de floculation obtenus pour 0,075% de PEI à pH 7,5 et 0,100 % de PEI à pH 8,5.

AG		Surnageant de broyage (SBr)	Culot 0,075% de PEI pH 7,4	Culot 0,100% de PEI pH8,5
acide myristique	14:00	0,7%	0,6%	0,7%
acide palmitique	16:00	20,6%	19,1%	18,1%
acide stéarique	18:00	2,0%	1,9%	2,5%
acide oléique	18:1n-9c	13,1%	14,3%	14,1%
acide elaïdique	18:1n-9t	5,2%	4,9%	4,9%
acide linoleique	18:2n-6c	8,0%	9,3%	8,1%
acide linolélaïque	18:2n-6t	29,1%	28,6%	29,5%
acide gamma-linolenique	18:3n-6	2,7%	2,5%	2,3%
acide alpha-linolenique	18:3n-3	13,3%	13,2%	13,9%
acide arachidique	20:00	2,6%	2,6%	2,7%
acide arachidonique	20:4n-6	1,3%	1,4%	1,6%
acide docosadiénoïque	22:2n-6	1,3%	1,4%	1,5%

Les résultats montrent une forte similitude entre les différents profils. Dans les conditions de floculation retenues, le PEI ne présente donc pas de spécificité d'interaction et tous les lipides ont été floculés. Ainsi, les acides gras majoritaires (en gras dans le Tableau 17) sont les acides palmitique (18,1 à 20,6 %), oléique (13,1 à 14,3 %), linolélaïdique (28,6 à 29,5 %) et alpha-linolénique (13,2 à 13,9 %). Les petites différences observées ont été considérées comme non significatives car l'analyse n'a été réalisée qu'une seule fois.

Si l'on compare les quantifications des acides gras du surnageant de broyage avec ce qui avait été obtenu lors de la caractérisation globale de la biomasse (Partie 1 des Résultats et Discussion), les mêmes acides gras majoritaires sont observés. Certaines teneurs sont légèrement différentes, en particulier pour l'acide alpha-linolénique (~13 % contre 17 % dans la biomasse), et l'acide oléique (13 à 14 % contre 16 % dans la biomasse). Néanmoins, il est difficile de savoir si ces différences sont significatives. Tout d'abord, les analyses n'ont pas été réalisées sur le même lot de biomasse, ce qui peut expliquer la variabilité des teneurs. Par ailleurs, l'analyse réalisée sur la biomasse correspond à la totalité des lipides extraits après broyage (surnageant + culot de broyage), alors qu'ici seul le surnageant a été analysé. Ces 2 acides gras réagissent peut-être différemment lors du broyage en restant en plus grande quantité dans le culot. Enfin, l'analyse de la biomasse a été réalisée au laboratoire GEPEA de Saint-Nazaire, alors que les surnageants ont été analysés à l'Institut Pascal. Même si la méthode est globalement la même, de petites différences de protocole (en particulier lors de l'estérification des acides gras avant injection) pourraient expliquer ces différences.

A l'issue de ces essais, il est apparu important d'évaluer les propriétés fonctionnelles des différents surnageants afin d'envisager la valorisation des fractions hydrosolubles obtenues comme agent émulsifiant.

3.3.Évaluation des propriétés fonctionnelles des fractions hydrosolubles

Afin de pouvoir comparer les résultats avec ceux obtenus précédemment sur la souche d'*H. pluvialis* verte, les fractions hydrosolubles ont été lyophilisées, puis remises en solution à pH neutre et à une concentration de 2 g/L en protéines. Ainsi, les capacités émulsifiantes (CE), les stabilités (SE) et les index d'activité émulsifiante (IAE) ont pu être comparées aux valeurs des surnageants de broyage, rétentat et perméat d'ultrafiltration de la souche verte, obtenus également pour des concentrations à 2 g/L en protéines (Tableau 18).

Tableau 18 Propriétés émulsifiantes du surnageant de broyage (SBr) et des surnageants de floculation obtenus avec 0,075 % de PEI à pH 7,4 et 0,100 % de PEI à pH 8,5. Pour rappel, les valeurs du surnageant de broyage de la souche d'*H. pluvialis* verte (SBv), du rétentat et du perméat d'ultrafiltration à 1 kDa ont été reportés. Capacité émulsifiante (CE, mL d'huile / g de protéines), stabilité d'émulsion (SE, %) et index d'activité émulsifiante (IAE, m²/g).

Echantillons (2 g/L)	Propriétés émulsifiantes		
	CE (mL d'huile / g de protéines)	SE (%)	IAE (m ² /g)
SBr	2074 ± 27	71 ± 2	114 ± 9
0,075 % PEI pH 7,4	1921 ± 12	75 ± 1	121 ± 5
0,100 % PEI pH 8,5	1343 ± 21	42 ± 3	43 ± 8
SBv	2106 ± 48	75 ± 3	119 ± 10
Rétentat 1 kDa	2479 ± 65	77 ± 1	101 ± 6
Perméat 1 kDa	989 ± 53	30 ± 4	27 ± 3

Les capacités émulsifiantes du surnageant de broyage d'*H. pluvialis* rouge (SBr) et du surnageant de floculation obtenu pour 0,075 % de PEI à pH 7,4 sont du même ordre de grandeur (respectivement 2074 ± 27 et 1921 ± 12 mL d'huile/g de protéines). Ces valeurs sont similaires à celles obtenues pour le surnageant de broyage d'*H. pluvialis* vert (SBv) et légèrement inférieures à celles du rétentat d'ultrafiltration à 1 kDa précédemment testé. Tout d'abord, ces résultats confirment que bien que le SBr soit naturellement moins riche en protéines que le SBv, si la concentration en protéines est normalisée (ici 2 g/L), les capacités émulsifiantes sont similaires, indiquant qu'ils contiennent globalement le même type de protéines (poids moléculaires et hydrophobicité). Pour le surnageant de floculation obtenu pour 0,075 % de PEI à pH 7,4, l'étude en chromatographie d'exclusion stérique a montré une légère perte en protéines de haut poids moléculaires. Néanmoins, cette perte est limitée puisque près de 90% des protéines initialement présentes dans le SBr sont conservées. De ce fait, il semble logique que la capacité émulsifiante mesurée soit du même ordre de grandeur. En revanche, la capacité émulsifiante mesurée pour le surnageant de floculation obtenu pour 0,100 % de PEI à pH 8,5 est significativement plus faible (1343 ± 21 mL d'huile / g de protéines). Ceci peut s'expliquer par la perte importante de protéines de hauts poids moléculaires observée par chromatographie d'exclusion stérique. Néanmoins, cette capacité émulsifiante est plus importante que celle du perméat d'ultrafiltration à 1 kDa précédemment testé pour la souche verte, et qui était constitué majoritairement de peptides. En ce qui concerne les valeurs de stabilité mesurées après 24h, les résultats montrent la même tendance, à savoir des stabilités équivalentes pour le SBr, le SBv, le surnageant de floculation obtenu pour 0,075 % de PEI à pH 7,4 et le rétentat d'ultrafiltration

(71 ± 2 , 75 ± 3 , 75 ± 1 et 77 ± 1 % respectivement). Pour le perméat d'ultrafiltration à 1 kDa, une stabilité plus faible avait été observée (30 ± 4 %). Pour expliquer ce résultat, une hypothèse liée à la présence de protéines de plus faibles poids moléculaires a été formulée. En effet, il a été montré que les molécules de hautes masses molaires limitent le phénomène de coalescence et agissent contre la dégradation de l'émulsion par la présence de forces stériques importantes (Damodaran, 2005 ; Choplin et al., 2006). En revanche, les molécules de faibles poids moléculaires ont très peu de forces stériques, ce qui réduit leur capacité à maintenir une émulsion stable. Dans le cas du surnageant de floculation obtenu pour 0,100 % de PEI à pH 8,5, la stabilité observée est intermédiaire entre celles des surnageants de broyage et celle du perméat d'ultrafiltration (42 ± 3 %). Ce résultat semble donc cohérent puisque le poids moléculaire moyen des protéines qui le constitue est également intermédiaire entre ces deux matrices.

Enfin, pour l'index d'activité émulsifiante, les valeurs sont à nouveau équivalentes pour le SBr, le SBv, le surnageant de floculation obtenu pour 0,075 % de PEI à pH 7,4 et le rétentat d'ultrafiltration (114 ± 9 , 119 ± 10 , 121 ± 5 , et 101 ± 6 % respectivement). Le surnageant de floculation obtenu pour 0,100 % de PEI à pH 8,5 présente lui un IAE intermédiaire (43 ± 8 %) entre celui de ce premier groupe et la valeur obtenue pour le perméat d'ultrafiltration à 1 kDa (27 ± 3 %). Encore une fois, ce résultat est cohérent puisque l'importante valeur de l'index d'activité émulsifiante (IAE) associée à la stabilité reflète une grande surface interfaciale et la déstabilisation de l'émulsion due à la coalescence est probablement freinée par les composés de hautes masses molaires (Dickinson and Stainsby, 1982).

4. Conclusion partielle

La floculation au PEI sur des volumes de 500 mL a donc confirmé les résultats obtenus précédemment pour des volumes de 25 mL pour les deux conditions retenues. Elle permet donc un fractionnement efficace des fractions hydrosolubles et liposolubles, avec 89,8 % des protéines et 100 % des sucres conservés dans le surnageant pour une floculation avec 0,075 % de PEI et à pH 7,4, et 61,2 % des protéines et 100 % des sucres conservés dans le surnageant pour une floculation avec 0,100 % de PEI et à pH 8,5. L'analyse de répartition des profils de poids moléculaires par chromatographie d'exclusion stérique a montré que les protéines perdues correspondent principalement à des protéines de haut poids moléculaire, peut-être « entraînés » par la floculation des lipides et pigments. Dans les 2 conditions testées, la majorité des lipides et des pigments se retrouvent dans le culot, d'où ils peuvent être facilement extraits (respectivement 94 % et 96 %). La faible quantité de pigments résiduels dans le

surnageant de floculation avec 0,075 % de PEI et à pH 7,4, responsable d'une turbidité à 750 nm non nulle (0,14 uA) a été identifiée comme étant très majoritairement du β -carotène, pigment présentant un moindre intérêt économique par rapport à l'astaxanthine.

L'analyse des propriétés fonctionnelles des surnageants de floculation a montré que pour le surnageant de floculation avec 0,075 % de PEI et à pH 7,4, la capacité émulsifiante, la stabilité de l'émulsion, et l'index d'activité émulsifiante sont similaires à ceux du surnageant de broyage non fractionné, alors que les performances sont dégradées pour une floculation avec 0,100 % de PEI et à pH 8,5.

L'ensemble de ces résultats confirme donc l'intérêt de la floculation au PEI, qui n'avait jamais été testée sur des microalgues, pour le fractionnement des molécules hydrosolubles et liposolubles d'*Haematococcus pluvialis*. La condition de traitement avec 0,075 % de PEI et à pH 7,4 semble être le meilleur choix puisqu'elle permet un meilleur fractionnement liposolubles/hydrosolubles en limitant les pertes en protéines et sans dégradation des propriétés fonctionnelles par rapport au surnageant de broyage non fractionné. Par ailleurs, la quantité de PEI étant plus faible, le coût de traitement sera d'autant moins élevé. Cet aspect économique est évidemment un point important à prendre en considération lors de la mise en place d'un schéma de bioraffinerie. Dans le cas de la floculation au PEI, le coût de traitement semble raisonnable. Dans le cas de cette étude, le PEI a été acheté auprès de la société Sigma-Aldrich au tarif de 60 euros/L, mais il est probable que le tarif serait inférieur si le volume d'achat était plus important. Néanmoins, sur cette base tarifaire, et sachant que le traitement nécessite 150 mL de PEI pour 100 L de surnageant (2 kg MS de biomasse) le coût serait donc de 4,5 euros par kg de biomasse sèche. Enfin, plusieurs pistes existent afin d'optimiser encore ce procédé. Tout d'abord, la possibilité de réutilisation du PEI doit être envisagée après récupération de la fraction liposoluble, ce qui permettrait d'abaisser encore le coût de traitement. Afin de faciliter cette réutilisation, il serait intéressant de tester l'efficacité du PEI fixé sur un support. En effet, le PEI existe sous une forme greffée sur des billes de silice pour des applications en chromatographie basse pression. Si les performances de floculation du PEI ne sont pas altérées par ce greffage, l'utilisation de ce type de support pourrait permettre une séparation du flocculat par simple décantation (à la place d'une centrifugation), et la réutilisation des billes pour un nombre de cycles qui reste à déterminer. Enfin, l'utilisation de ce support pourrait peut-être éviter l'étape de dilution du surnageant au $\frac{1}{2}$ qui implique par exemple la nécessité de reconcentrer la fraction hydrosoluble si l'on veut l'exploiter pour ses propriétés fonctionnelles.

Partie 4 Fractionnement lipides / pigments par chromatographie de partage centrifuge

Les recherches décrites dans cette partie ont pour but de présenter le fractionnement des composés liposolubles : les lipides et les pigments. La séparation de ces deux familles de molécules est l'une des problématiques majeures de la bioraffinerie de *H. pluvialis*. En effet les lipides, plus particulièrement les TAG, sont les matières premières du biodiesel. Les pigments caroténoïdiens, dont l'astaxanthine, présentent une forte valeur ajoutée dans différents domaines d'application. Néanmoins, l'astaxanthine commerciale est actuellement extraite majoritairement par CO₂ supercritique et disponible sous la forme d'une huile contenant 1 à 5 % d'astaxanthine. Il ne s'agit donc pas d'un produit purifié, et dans le cadre d'une bioraffinerie, les lipides étant destinés à la production de biodiesel, il est essentiel de développer un procédé de séparation efficace.

L'une des solutions technologiques envisageable est l'utilisation de la chromatographie de partage centrifuge. Il s'agit d'une chromatographie liquide-liquide basée sur la différence de partage des solutés entre deux phases liquides non miscibles. Les solutés sont séparés en fonction de leur coefficient de partage (ou coefficient de distribution, K_D) qui correspond au ratio de la concentration du soluté d'intérêt dans la phase mobile sur sa concentration dans la phase stationnaire. Ce procédé de purification a été largement utilisé pour la séparation de composés bioactifs issus de végétaux et de certaines algues. Des essais de purification ont été reportés sur une utilisation sur des produits issus de microalgues (Alvarez *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2014; Marchal *et al.*, 2013). Néanmoins, cette méthode n'a jamais été mise en œuvre avec pour objectif de séparer les lipides et les pigments issus d'une microalgue. Les essais ont été conduits sur une fraction liposoluble extraite du culot de broyage d'*H. pluvialis* Rouge.

Dans un premier temps, il est nécessaire de choisir le système de solvants à utiliser. Pour chaque essai, des analyses de pigments et d'acides gras ont été réalisées afin de sélectionner le système de solvant permettant la meilleure séparation. Puis, le système retenu a été testé avec des conditions opératoires différentes afin d'améliorer le fractionnement.

1. Choix du système bi-phasique

Le fractionnement de solutés par CPC dépend principalement de la sélection du système de solvants adéquat. Les critères à prendre en compte pour choisir le système de solvants sont liés aux propriétés intrinsèques de l'échantillon et des molécules à séparer (solubilité, polarité...), mais également aux propriétés physicochimiques des solvants. Il est donc nécessaire de choisir une combinaison de solvants non miscibles, dans laquelle l'échantillon est très soluble, et pour lesquels les molécules à séparer présentent des coefficients de partage différents. Comme présenté dans la synthèse bibliographique (paragraphe 5.1.1), les systèmes de solvants utilisés sont généralement binaires ou ternaires. Dans le cadre de nos essais, plusieurs solvants ont été présélectionnés. L'heptane est un solvant organique apolaire qui possède, en tant qu'alcane, une grande affinité avec les acides gras et qui permet de les solubiliser. Il a été utilisé dans plusieurs études pour purifier des composés lipidiques de microalgues au cours d'une CPC (Bousquet et Le Goffic, 1995). Il est préféré au chloroforme, solvant utilisé pour l'extraction par le protocole de Bligh and Dyer, parce que ce dernier est toxique. Dans la littérature, l'acétone est utilisée pour l'extraction des pigments (Dong *et al.*, 2014; Lichtenthaler and Buschmann, 2001; Mendes-Pinto *et al.*, 2001), c'est donc un solvant dans lequel les pigments seront très solubles. Le méthanol a été reporté comme solvant de prédilection dans la séparation liquide-liquide de xanthophylles, une forme de caroténoïde auquel appartient l'astaxanthine (Petracek and Zechmeister, 1956). Par ailleurs, le méthanol présente la même polarité (5,1) que l'acétone. Enfin, l'acétonitrile a été sélectionné car il est non miscible avec l'heptane et il présente une polarité légèrement plus importante (5,8) que l'acétone en ayant une bonne affinité avec les pigments chlorophylliens et caroténoïdiens (Lichtenthaler and Buschmann, 2001). L'heptane est cependant miscible avec l'acétone. Ce couple de solvants ne peut donc pas être retenu. En revanche, l'heptane est moins dense que l'acétonitrile ou le méthanol, (0,684 0,786 et 0,796 respectivement), il peut donc être la phase supérieure du système bi-phasique et la phase stationnaire dans la colonne de CPC. Les deux autres solvants plus denses seront la phase inférieure et seront élués en tant que phase mobile au cours de la CPC. Deux couples de solvants sont donc présélectionnés : heptane : méthanol et heptane: acétonitrile dans la proportion 50 : 50 (v : v). Afin d'évaluer les capacités de séparation de ces systèmes, le coefficient de partage des pigments dans les 2 cas est évalué. Le coefficient de partage, ou coefficient de distribution K_D , correspond au rapport de concentrations d'une substance dans chacune des phases ($K_D = \text{concentration dans la phase inférieure} / \text{concentration dans la phase supérieure}$; Toribio, 2007). Pour l'évaluer, les 2 systèmes bi-phasiques sont préparés dans des tubes avec 5 mL de chaque

système de solvants avec différentes compositions présentées au paragraphe 5.3 de la section Matériels et Méthodes. Le K_D dépendant de la concentration, 50 μL de l'échantillon est ajouté, en essayant de recréer les mêmes conditions de concentration que celles qui seront mises en place lors des essais. Après obtention d'un équilibre, les concentrations en chlorophylles et en caroténoïdes dans chacune des phases sont évaluées au spectrophotomètre selon la méthode décrite dans la section Matériels et Méthodes (paragraphe 3.3.1). Néanmoins, cette évaluation des concentrations est approximative, les équations utilisées ayant été établies uniquement pour des mesures de pigments dans de l'acétone. Par ailleurs, cette méthode ne permet pas d'évaluer la distribution des lipides entre les deux phases. Des valeurs de K_D « indicatives » pour les pigments ont cependant été calculées et sont reportées dans le Tableau 19.

Tableau 19 Valeurs de K_D indicatives pour les pigments dans les 2 systèmes de solvants

	Heptane : méthanol	Heptane : acétonitrile
K_D caroténoïdes	0,82	0,93
K_D chlorophylles	0,63	0,45

Les K_D obtenus pour les caroténoïdes sont de 0,82 et 0,93 pour l'heptane : méthanol et l'heptane : acétonitrile respectivement. Tandis que ceux des chlorophylles sont plus faibles : 0,63 et 0,45 respectivement. Pour une meilleure résolution de la séparation, les K_D doivent être compris entre 0,5 et 1. Ceux des caroténoïdes sont donc satisfaisants quelque soit le système bi-phasique. Bien que le coefficient de partage (0,45) des chlorophylles pour le couple heptane : acétonitrile soit légèrement inférieur à l'intervalle optimal défini par Ito (2005) (0,5), nous l'avons testé. En effet, étant donné que le K_D des caroténoïdes est proche de 1 (0,93), le système bi-phasique devrait permettre de séparer les caroténoïdes avec une bonne résolution lors de la CPC. De plus l'écart qui existe entre les deux K_D est un atout car selon Shahidi (2006) cette différence permettrait de mieux séparer ces deux familles de pigments.

2. Fractionnement par CPC

2.1. Système heptane : acétonitrile

Après avoir choisi les systèmes bi-phasiques, un essai de fractionnement est mis en œuvre, en commençant par le système heptane : acétonitrile. La colonne est remplie de la phase stationnaire (heptane) puis le système est mis en rotation à 1800 rpm. La phase mobile

(acétonitrile) est introduite en mode descendant, c'est-à-dire que la phase mobile plus dense est éluée à travers la phase stationnaire, à un débit de 8 mL/min. Après la mise en équilibre, l'extrait du culot de HPR contenant les lipides et les pigments est injecté. Tout au long de l'analyse, des échantillons de la phase mobile sont récoltés toutes les minutes, le débit d'éluion est fixé à 3 mL/min. Les résultats avec le système heptane : acétonitrile montrent que dans les conditions testées, les chlorophylles et les caroténoïdes ne sont pas fractionnés. En effet le spectre des échantillons récoltés, par exemple la Figure 53 b, révèle que les caroténoïdes bien que majoritaires dans certains tubes, n'en demeurent pas moins mélangés aux chlorophylles. La couleur brune de certains tubes collectés (Figure 53 a) confirme l'analyse spectrophotométrique.

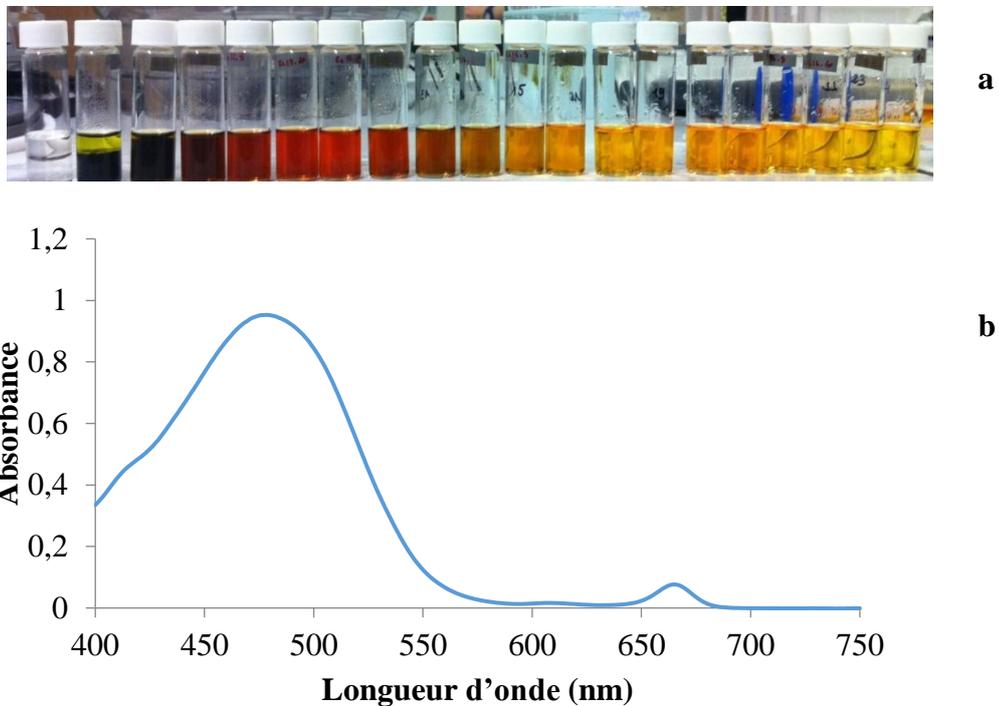


Figure 53 Echantillons de phase mobile (acétonitrile) récoltés en cours d'analyse CPC (a) en mode descendant avec un système heptane : acétonitrile et exemple d'un spectre (b).

Afin d'améliorer la distribution des pigments, de l'eau ultra-pure a été rajoutée aux systèmes bi-phasiques précédemment sélectionnés. Le volume d'eau représente 2 % du volume de la phase inférieure (méthanol ou acétonitrile). D'après la littérature les solvants organiques aqueux, par exemple du méthanol aqueux, permettent de perfectionner la séparation des caroténoïdes. L'ajout de l'eau élargi l'intervalle de polarité du système bi-phasique et améliore le fractionnement (Krinsky, 1963; Krinsky et Goldsmith, 1960).

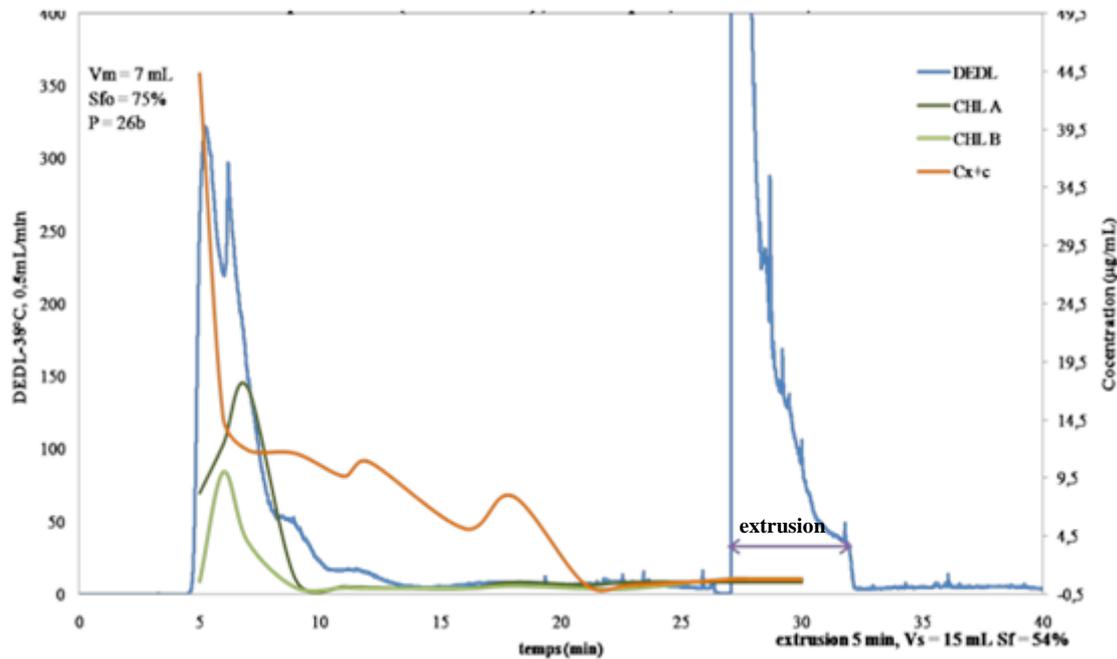
2.2. Système Heptane : acétonitrile (+ 2 % eau)

Excepté cet ajout d'eau dans la phase mobile, et la dilution de l'échantillon au 10^{ème}, ce nouvel essai est réalisé dans les mêmes conditions opératoires que le précédent : la colonne est mise en rotation à 1800 rpm, le débit d'élution de la phase mobile est réglé à 3 mL/min, des échantillons sont recueillis. En parallèle, une fraction de cette phase mobile est envoyée vers un détecteur DEDL en raison de 0,5 mL/min afin d'être analysé. La récolte s'achève lorsque la coloration de la phase mobile s'estompe, par la suite la phase stationnaire est extrudée. Cette extrusion permet d'analyser la phase stationnaire afin de déterminer s'il contient éventuellement des lipides et des pigments résiduels. L'analyse des échantillons et de l'extrudat se fera de manière semi-quantitative. La concentration en pigments sera calculée selon les équations présentées dans le chapitre Matériel et Méthodes, tandis que la présence de lipides sera vérifiée par chromatographie en phase gazeuse.

Dans un premier temps, l'observation des tubes collectés pendant les 28 minutes d'élution montre que l'ajout de l'eau modifie le profil de coloration de la phase mobile sortante (Figure 54 a). Afin d'avoir une évaluation rapide de l'efficacité de séparation, un aliquot de quelques tubes contenant la phase mobile est collecté, séché, repris dans de l'acétone puis analysé au spectrophotomètre selon le protocole présenté en Matériels et Méthodes (paragraphe 3.3.1). Les résultats obtenus montrent que la majorité des pigments est élué en début de manipulation. En effet, pendant les premières minutes de la CPC, les caroténoïdes sont élués avec les chlorophylles bien que ceux-ci soient majoritaires. Au-delà de 10 minutes d'élution, les tubes collectés ne contiennent que des caroténoïdes mais la teneur est plus faible qu'au tout début (44 µg/mL versus 8 µg/mL). Ces concentrations en pigments ont été superposées au signal du DEDL sur la Figure 54 b. Le signal du DEDL révèle la sortie majoritaire des composés durant les 10 premières minutes de l'élution bien qu'il ne permette pas de différencier la sortie des lipides de celle des pigments. Néanmoins, le signal DEDL important durant les 10 premières minutes coïncide avec la sortie des pigments quantifiés au spectrophotomètre. Ce profil suggère que les lipides sont coélusés avec les pigments en début de CPC. L'analyse CG confirme la présence d'acide gras palmitique dans les premières fractions collectées. Dans la biomasse de *H. pluvialis*, l'astaxanthine est majoritairement sous forme estérifiée (Lorenz et Cysewski, 2000; Miao *et al.*, 2006), en particulier à de l'acide palmitique. Même s'il est difficile de statuer sur l'origine de l'acide palmitique dans ces premiers tubes (lipide libre ou estérifié sur l'astaxanthine), aucun acide gras n'a été détecté dans les fractions de phase mobile au-delà de la dixième minute.



a



b

Figure 54 Tubes contenant les échantillons de phase mobile (acétonitrile + 2 % eau) récoltés en cours d'analyse CPC en mode descendant avec un système heptane : acétonitrile (+ 2 % eau) (a) et signal DEDL superposé aux courbes de concentrations en pigments (chlorophylles *a* (courbe vert foncé) et *b* (courbe vert clair), caroténoïdes (courbe orange)) des aliquots de phase mobile récoltés.

Après l'élution, une extrusion a été réalisée afin de sortir la phase stationnaire de la colonne. Un important signal DEDL est alors observé. L'extrudat possède deux phases (mobile et stationnaire) et le système biphasique est coloré. La présence de pigments est confirmée par l'analyse spectrophotométrique. La phase stationnaire est riche en pigments, dont la majorité est caroténoïdien (12,80 µg/mL). Tandis que la phase inférieure en contient moins de 1µg, la majorité ayant été collectée au cours de l'élution (Tableau 20). En ce qui concerne les lipides, ils ne sont pas détectés dans la phase mobile, mais uniquement dans la phase stationnaire. Les lipides majoritairement détectés dans cette phase sont les acides palmitique, oléique et stéarique (Tableau 20).

Tableau 20 Concentrations en chlorophylle *a* (Chl *a*), en chlorophylle *b* (Chl *b*) et en caroténoïdes (Cx+c) des phases stationnaire et mobile de l'extrudat issu de l'essai CPC heptane : acétonitrile (+ 2 % eau) et identification des acides gras présents.

 Extrudat	Pigments (µg/mL)			Acides gras
	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Cx+c	
Phase stationnaire (heptane)	1,35	2,24	12,80	Palmitique, oléique, stéarique
Phase mobile (acétonitrile : eau)	0,52	0,85	0,79	ND*

* non détecté

A l'issue de cet essai de CPC, on note que le système bi-phasique heptane : acétonitrile (+ 2 % eau) permet de purifier les caroténoïdes en fin d'élution. Néanmoins la majorité d'entre eux est mélangée aux chlorophylles et éluee dès les premières minutes de CPC. Dans les conditions de mise en œuvre de la CPC, les chlorophylles *a* et *b* sont éluees au même moment et ne sont donc pas fractionnées. Quant à la phase stationnaire extrudée, elle contient encore des pigments (peut-être de type beta-carotène qui est plus polaire), mais également des lipides. Afin d'améliorer la séparation, un nouvel essai est réalisé avec le système heptane : méthanol (+ 2 % eau).

2.3.Système Heptane : méthanol (+ 2 % eau)

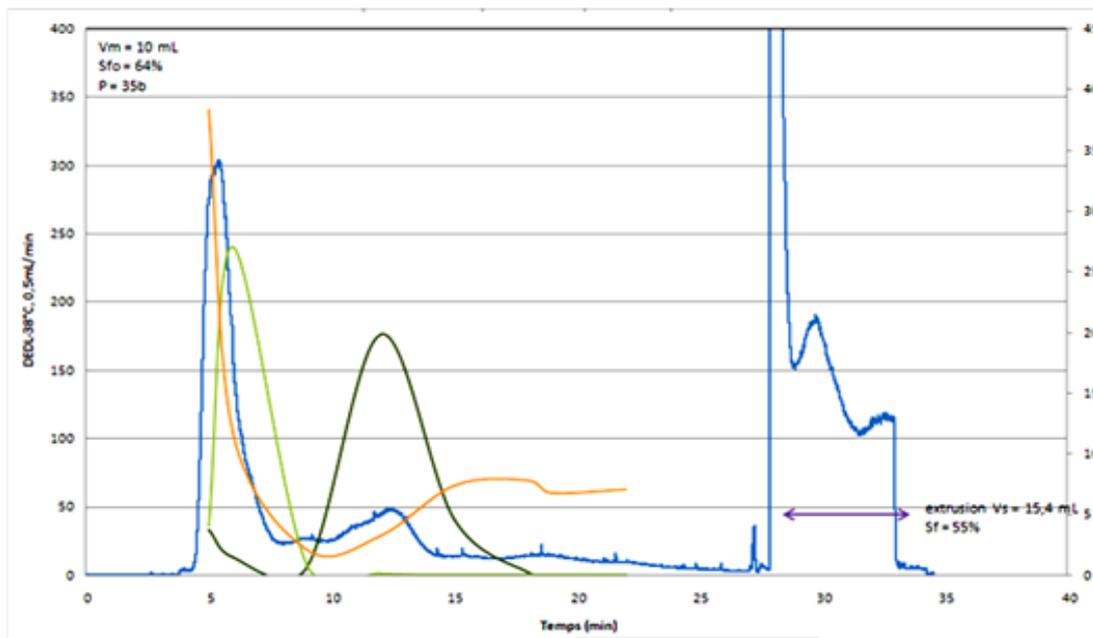
La CPC est menée à nouveau en mode descendant, avec une vitesse de rotation de 2100 rpm et un débit d'élution de 3 mL/min. La même quantité d'extrait est injecté (800µL à 3,8 mg/mL) et des échantillons de phase mobile sont récoltés tandis qu'une autre fraction est dirigée vers le détecteur DEDL. Nous avons réalisé les mêmes analyses que précédemment.

Le profil de coloration des tubes collectés est différent de celui du système heptane : acétonitrile (+ 2 % eau) (Figure 55 a). La coloration verte dans les tubes est plus étalée et entre les tubes verts s'intercalent des tubes de couleur orangé probablement des caroténoïdes. Cette appréciation visuelle est confirmée par le dosage des pigments dans la phase mobile, qui montre que ces deux « groupes » de verts correspondent à la chlorophylle *a* et *b* respectivement. Les conditions utilisées dans cet essai de CPC, permettent de les séparer nettement, la chlorophylle *a* éluee en premier, suivie de la chlorophylle *b* (Figure 55 b). Cependant les chlorophylles ne

sont pas pures, on peut constater qu'elles sont mélangées à une faible proportion de caroténoïdes. Ces derniers sont élués en grande quantité dès le début l'élution, où ils pourraient présenter un taux de pureté élevé avant que l'élution de la chlorophylle ne débute. A nouveau, de l'acide palmitique est détecté dans le tube contenant le maximum de caroténoïdes puis dans aucun des tubes dosés.



a



b

Figure 55 Tubes contenant échantillons de phase mobile (acétonitrile+2%eau) récoltés en cours d'analyse CPC en mode descendant avec un système heptane : méthanol (+ 2 % eau) (a) et signal DEDL superposé aux courbes de concentrations en pigments (chlorophylles *a* (courbe vert foncé) et *b* (courbe vert clair), caroténoïdes (courbe orange) des fractions de phase mobile récoltés.

L'analyse de l'extrudat de ce système bi-phasique au méthanol aqueux montre des similitudes avec le système avec de l'acétonitrile (+ 2 % eau). En effet l'extrudat est un mélange des phases mobile et stationnaire qui contiennent tous les deux des pigments. L'heptane contient aussi des acides gras stéarique et palmitique. La teneur en pigments caroténoïdiens est plus élevée que celle de la phase heptane de l'essai avec acétonitrile (+ 2 % eau).

Tableau 21 Concentrations en chlorophylle *a* (Chl *a*), en chlorophylle *b* (Chl *b*) et en caroténoïdes (Cx+c) des phases stationnaire et mobile de l'extrudat issu de l'essai CPC heptane : méthanol (+ 2 % eau) et identification des acides gras présents.

Extrudat	Pigments ($\mu\text{g/mL}$)			Acides gras
	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Cx+c	
Phase stationnaire (heptane)	8,9	4,2	30	Palmitique, oléique, stéarique
Phase mobile (méthanol : eau)	4,7	4,2	4,1	ND*

L'objectif de ces premiers essais était de choisir le système bi-phasique le plus adapté pour fractionner les lipides des pigments, et éventuellement les pigments entre eux. Les résultats des essais sur les systèmes bi-phasiques heptane : acétonitrile (+ 2 % eau) et heptane : méthanol (+ 2 % eau) présentent des similitudes. Des caroténoïdes sont élués dès les premières minutes de CPC. La CG détecte la présence d'acides gras dans les tubes riches en caroténoïdes ainsi que dans la phase stationnaire extrudée. Néanmoins avec le mélange heptane : méthanol (+ 2 % eau), le fractionnement des pigments est plus poussé avec l'éluion de chlorophylle *a*, *b* et de caroténoïdes presque purs. De ce fait, ce système a été choisi afin de poursuivre les travaux. Plusieurs modifications ont cependant été apportées. Tout d'abord, à la place de l'extrusion, le dual mode a été testé afin de fractionner le contenu de la phase stationnaire devenue phase mobile. Une analyse plus poussée des lipides et des pigments a été réalisée, du point de vue quantitatif (afin d'établir des bilans matière au niveau des lipides et des pigments) mais également du point de vue qualitatif, avec une identification des pigments par CLHP. Pour permettre cela, une quantité plus importante d'échantillon extraite du culot de HPR a été injectée.

3. Fractionnement de l'extrait liposoluble de HPR

Le système bi-phasique retenu, l'heptane : méthanol (+ 2 % eau), a à nouveau été testé en CPC. Le volume de l'extrait lipidique du culot injecté est passé de 800 μL à 2 mL, soit un volume 2,5 fois plus important, et à une concentration en liposoluble de 39,5 mg/mL. Le mode descendant des essais précédents est remplacé par le « Dual mode ». Cela se traduit par le fait que la phase mobile (méthanol (+ 2 % eau)) devient la phase stationnaire en cours de manipulation et la phase stationnaire initiale devient la nouvelle phase mobile (heptane). Les autres paramètres

opérateurs du procédé ont été conservés, notamment la vitesse de rotation à 2100 rpm, la pression 38 bar, le débit d'élution de la phase mobile à 3 mL/min ainsi que la collecte d'échantillons pendant une minute pour les besoins de la partie analytique post-CPC. Cette dernière comprend la quantification et l'analyse des lipides et des pigments par chromatographie gazeuse (CG) ou par chromatographie liquide haute pression (CLHP) respectivement. En revanche, en raison d'un problème technique, il n'a pas été possible d'obtenir de signal DEDL lors de cet essai.

3.1. Analyses quantitatives des lipides et pigments issus de la CPC

Les analyses de lipides et de pigments ont cette fois été réalisées sur tous les tubes élués en cours de procédé ce qui a permis de construire la Figure 56. Cette dernière représente la répartition des lipides et pigments élués au cours du procédé de séparation.

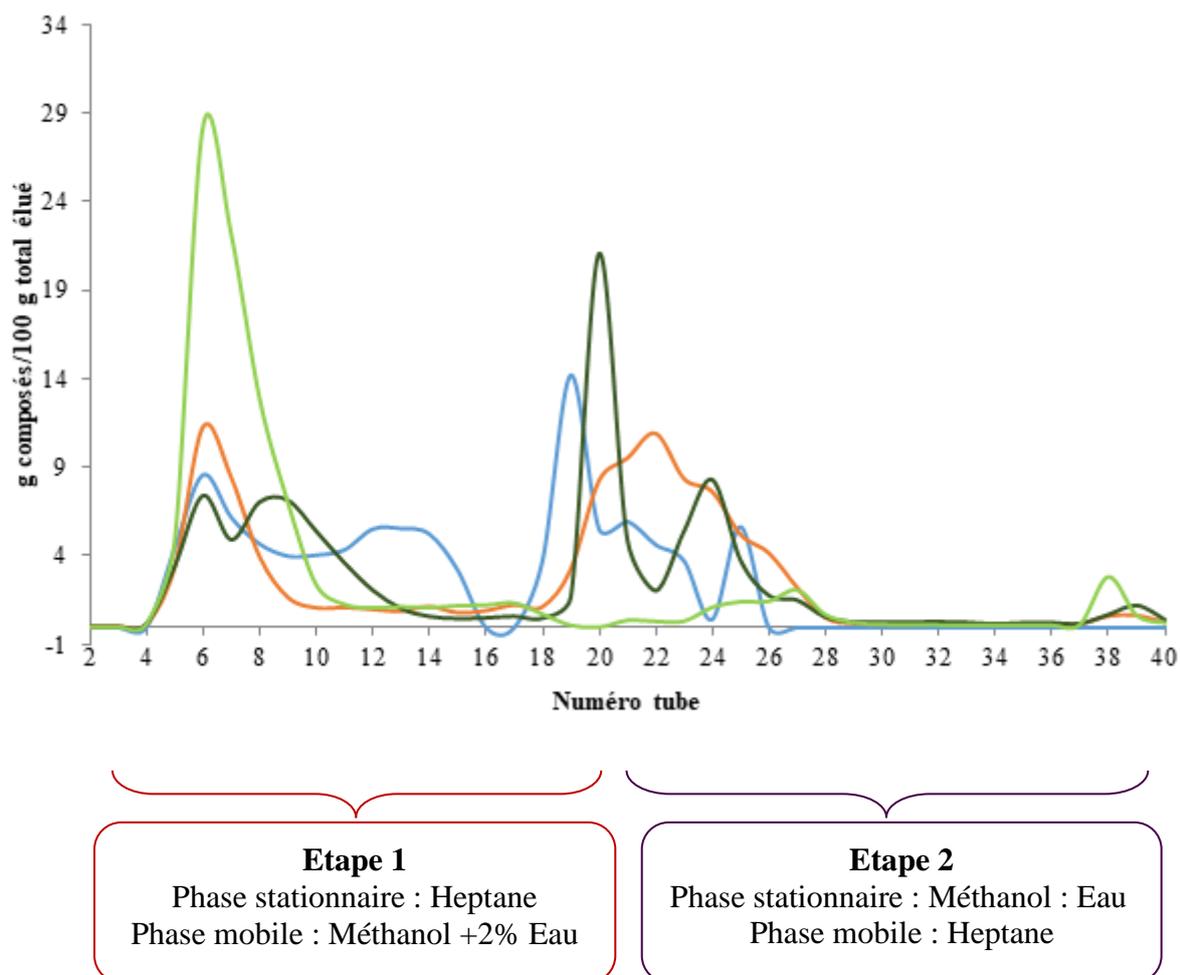


Figure 56 Répartition des lipides et pigments élués dans la phase mobile méthanol (+ 2 % eau) de l'étape 1 et heptane de l'étape 2 au cours de la CPC en Dual Mode. Chlorophylles a : courbe vert foncé ; chlorophylle b ; courbe vert clair ; caroténoïdes : courbe orange ; lipides : courbe bleue.

On observe dans la première étape qu'une forte proportion des pigments est éluee dès les premières minutes. Le tube 6 contient les teneurs les plus importantes en caroténoïdes et en chlorophylle *b*. Les concentrations détectées représentent respectivement 11 et 28 % des caroténoïdes totaux et chlorophylle *b* collectés au cours de l'élution. La chlorophylle *a* est présente, bien qu'en plus faible quantité que les autres pigments (7 % de la chlorophylle *a* éluee au cours de la séparation). On constate aussi la présence d'acides gras dans le mélange de pigments. On peut remarquer dans cette étape 1 des similitudes avec l'essai test du système heptane : méthanol (+ 2 % eau) avec 800 μ L d'injectat. Notamment dans l'élution dès les premières minutes des pigments avec moins de chlorophylle *a* et une majorité de caroténoïdes. La présence d'acides gras dans ce mélange est aussi commune au deux essais. Cependant, la résolution est moins nette sur cet essai à plus grand volume d'injectat. En effet les chlorophylles, en particulier la chlorophylle *b*, sont mélangées aux caroténoïdes. Cette perte en résolution pourrait être une conséquence de la hausse du volume d'injectat ou de la nature des solvants utilisés pour solubiliser l'extrait lipidique. En effet, un changement d'échelle peut entraîner une perte en résolution et donc une modification du fractionnement des pigments. Il a été reporté dans la bibliographie qu'augmenter le volume d'injection entraîne un « étalement » de l'élution des composés. Cet étalement est plus accentué lorsqu'il s'agit des composés ayant le moins d'affinité avec la phase stationnaire (Hermans-Lokkerbol *et al.*, 1997). Afin d'améliorer la résolution, une optimisation des conditions opératoires doit être envisagée, en particulier la vitesse de rotation ou le débit d'élution de la phase mobile (Kato *et al.*, 2008; Marchal *et al.*, 2003). L'autre hypothèse concerne la préparation de l'échantillon. En effet, pour l'essai initial, l'extrait a été repris dans de l'acétone pure. Puis il a été dilué au 10^{ème} dans la phase mobile avant l'injection. Dans cet essai, l'extrait lipidique a aussi été repris dans de l'acétone puis mélangé à du méthanol. La présence systématique de l'acétone est une contrainte de manipulation, en effet elle permet de mieux solubiliser le concentrat lipidique après évaporation du chloroforme (paragraphe 5.3 de la section matériels et méthodes). Cependant l'échantillon injecté contient une teneur en acétone plus importante (1/10 versus 1/4), et le volume injecté est également plus élevé. L'acétone étant miscible avec l'heptane, la composition de la phase stationnaire est donc modifiée, ce qui pourrait expliquer la rétention de la chlorophylle *a* dans la phase stationnaire ainsi que la baisse en résolution de la CPC.

La phase mobile de l'étape 1 totalise 87 % de la chlorophylle *b* éluee tout le long de la manipulation et moins de 45 % de chlorophylle *a*. En ce qui concerne les caroténoïdes, 38 % sont dans le méthanol (+ 2 % eau). Quant aux lipides, ils sont presque partagés à part égale,

avec 51 % des acides gras élués dans la phase méthanol (+ 2 % eau). Au cours de l'étape 2, qui correspond au changement de phases imposé par le Dual Mode, on observe un profil de distribution des solutés différent de celui de l'étape 1. En effet, dès le changement de mode, environ 15 % des lipides injectés sont élués dans un seul tube (tube 19), en même temps que des caroténoïdes ainsi qu'un peu de chlorophylle *a*. La majorité de la chlorophylle *a* est aussi élue dans le solvant heptanique et en deux temps (après 22 et 26 minutes, ce qui correspond aux tubes 20 et 24). Etant donné le caractère polaire de la chlorophylle *a*, elle est censée être élue dans l'étape 1. Cependant, l'étalement provoqué soit par la hausse du volume d'injection ou la présence d'acétone aurait décalé son élution dans la phase apolaire de l'étape 2. On peut observer deux pics de caroténoïdes moins intenses qu'à l'étape 1, mais non négligeable. Quarante neuf pourcent des lipides sont élués dans la phase heptane car probablement plus polaire que la phase méthanol (+ 2 % eau). Il en va de même pour les caroténoïdes qui sont composés d'un mélange de molécules colorées avec un degré de polarité différent. Cela pourrait d'ailleurs expliquer leur présence dans les deux phases mobiles, polaire et apolaire, testé au cours de la CPC. Contrairement à l'étape 1, l'étape 2 fractionne mieux les pigments des lipides. En effet, l'élution à la 22^{ème} minute ne contient quasiment que des caroténoïdes (92 % du tube), les lipides et les autres pigments ne sont présents qu'en très petites quantités (8 %).

3.2. Analyse qualitative des lipides et pigments issus de la CPC

Dans cette partie, l'identification des pigments caroténoïdiens ainsi que des acides gras élués au cours de cet essai de fractionnement CPC est présentée. L'extrait lipidique issu de *H. pluvialis* rouge révèle que le profil CLHP est identique à celui du surnageant de SBr. On y retrouve de la lutéine, de la cantaxanthine, du beta-carotène ainsi que des chlorophylles (*a* et *b*) et de l'astaxanthine libre ou estérifiée. En ce qui concerne l'analyse des fractions collectées en CPC, le tube 6 révèle qu'il contient de l'astaxanthine estérifiée, du beta-carotène, des chlorophylles et de la lutéine. En revanche, le tube 19 est composé uniquement de chlorophylles, de beta-carotène, sans lutéine ni astaxanthine libre. Par ailleurs, son profil d'acides gras est identique à celle de l'injectat initial (Figure 57).

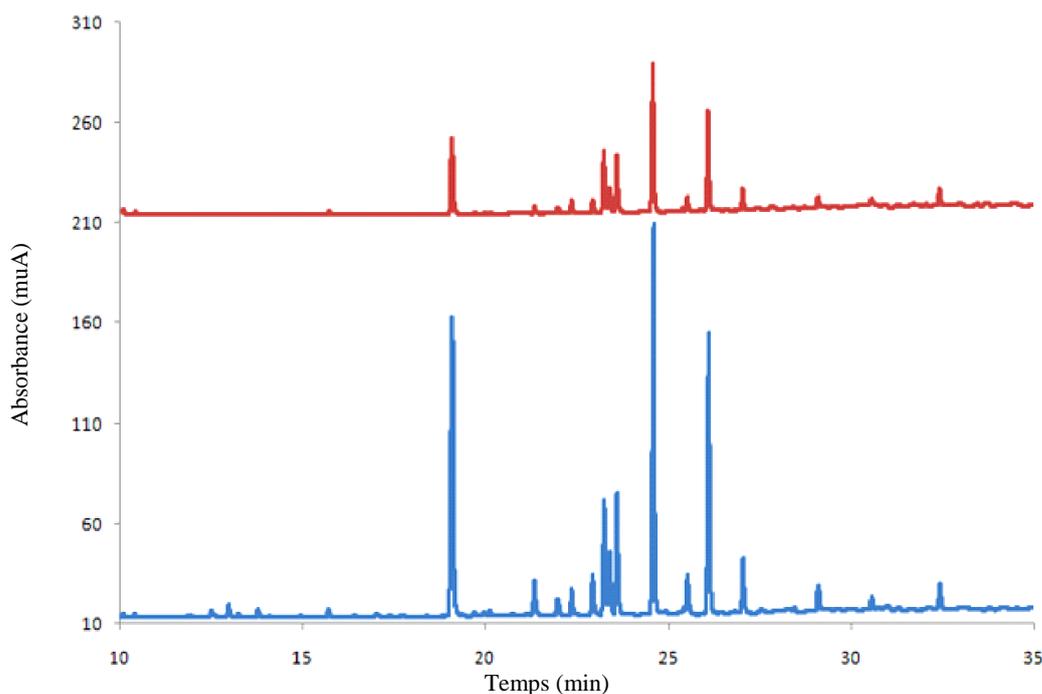


Figure 57 Profils CG de l'injectat initial (courbe bleue) et du tube 19 (courbe rouge) collecté au début du Dual Mode.

L'analyse CLHP révèle que le tube 22 contient une faible quantité de chlorophylles. Cela confirme l'analyse réalisée au spectrophotomètre, mais surtout identifie les caroténoïdes, composés majoritaires dans ce tube, comme étant de l'astaxanthine estérifiée. Ainsi donc, la CPC a permis d'atteindre l'objectif qui était fixé : séparer l'astaxanthine des lipides et éventuellement, la séparer des autres pigments. L'analyse réalisée en chromatographie en phase gazeuse indique que les acides gras présents sont de l'acide palmitique, de l'acide α -linoléique et de l'acide linoléique. Les deux premiers cités ont été identifiés dans la littérature comme les acides gras usuellement estérifiés à l'astaxanthine (Holtin *et al.*, 2009).

3.3. Conclusion partielle

La CPC utilisée avec le système bi-phasique heptane : méthanol (+ 2 % eau) dans les conditions testées permet le fractionnement partiel des fractions liposolubles. Lors de l'essai à plus grand volume, nous avons observé quelques différences avec l'essai test, probablement liée au scale up et/ou à la composition en solvant de l'échantillon injecté, néanmoins le fractionnement a pu être observé. En effet, 90% de l'astaxanthine estérifiée est retrouvée dans une fraction d'heptane éluée dans la phase 2 du Dual mode. La répartition des composés lipidiques et des autres pigments a montré que la chlorophylle *b* est éluée en majorité dans la

phase la plus polaire du système bi-phasique (méthanol (+ 2 % eau)) et que pour la chlorophylle *a c*'est le contraire. Les lipides sont élués dans la phase polaire mais avec une majorité collectée dans l'heptane dès le changement de mode (tube 19). L'analyse des acides gras démontre aussi que nous pouvons obtenir une composition en acide gras identique à celle de l'extrait initial, mais avec moins de pigments, il s'agit donc bien d'un fractionnement des lipides et pigments.

Ces premiers pas dans le fractionnement des composés lipidiques de *H. pluvialis* ont été assez concluants. En effet l'ensemble de ces résultats confirme l'intérêt de mettre en œuvre la CPC pour le fractionnement des lipides et des pigments issus d'*Haematococcus pluvialis*. Le système heptane : méthanol (+ 2 % eau) utilisé en Dual Mode a permis de purifier le pigment ayant la plus grande valeur ajoutée: l'astaxanthine. Néanmoins, des améliorations peuvent être apportées afin d'améliorer le fractionnement. Tout d'abord, l'étape de solubilisation de l'extrait lipidique doit être standardisée en asseyant de limiter la quantité d'acétone utilisée pour la solubilisation de l'échantillon. Une étude pourrait être menée sur les conditions opératoires tels que la vitesse de rotation et le débit d'élution de la phase mobile afin de les optimiser (Kato *et al.*, 2008; Marchal *et al.*, 2003). Enfin, malgré la quantité d'échantillon plus importante injectée, les quantifications des lipides et pigments ont été difficiles dans certains tubes car en limite de détection des méthodes. Afin de pouvoir établir des bilans matières plus fiables, il est important de monter encore en échelle, avec cette fois une colonne de chromatographie d'un volume plus important par exemple.

Conclusions et perspectives

Dans le domaine de la valorisation des microalgues, rares ont été les études qui présentent la caractérisation, l'extraction, le fractionnement et le potentiel de valorisation de l'ensemble des composés contenus dans une microalgue donnée. Le but de notre travail était donc d'apporter cette pierre manquante à l'édifice. Dans cette optique, nous avons travaillé avec la microalgue *Haematococcus pluvialis* sous deux formes : verte et riche en chlorophylle (HPV) et rouge (HPR), riche en caroténoïdes. Ce choix a été motivé par le potentiel de cette souche en tant que modèle pour la bioraffinerie mais aussi par la disponibilité de la souche en France.

Dans un premier temps, l'objectif était de déterminer la composition de la microalgue sous ces deux formes. Par la suite il s'agissait de quantifier et de caractériser chacune des fractions présentes avec un accent particulier mis sur les protéines, les lipides, les sucres et les pigments. Nous avons donc étudié l'influence du broyage (pression et nombre de passage) sur le rendement d'extraction de chacune des fractions d'intérêts. Nos études ont démontré que la forme verte de *H. pluvialis* libère un maximum de composés d'intérêts lorsqu'elle est broyée par 2 passages à 2 kbars. En outre, la modification du pH avant le broyage de 5,7 (natif) à pH = 7 ou à pH = 12, permet d'extraire une teneur plus importante en protéines soit + 10 % entre le natif et le neutre et quasiment l'intégralité des protéines extraites à pH alcalin. Une fois les conditions de broyage fixées, nous avons évalué le potentiel des protéines issues de la forme la plus riche en protéines, HPV. Tout d'abord, fractionner les protéines de la forme verte par précipitation au point isolélectrique compromet leur solubilisation post-précipitation. Toutefois, cette opération a révélé que le *pI* de la majorité des protéines intracellulaires solubles de HPV se situe au environ du pH = 6, information que l'on ne retrouvait pas dans la bibliographie à ce jour. En alternative à la précipitation acide, nous avons testé le fractionnement /concentration des protéines extraites à pH natif et neutre par ultrafiltration. Il s'avère qu'avec ce procédé membranaire, bien que les protéines ne soient pas séparées des autres molécules, on arrive à une concentration et un enrichissement en protéines de hauts poids moléculaires. La précipitation au sulfate d'ammonium quant à elle, permet une purification partielle de la fraction protéique, mais serait probablement compliquée à mettre en œuvre à l'échelle industrielle. Les extraits protéiques de HPV et leurs dérivés (rétentats, perméats) se sont révélés avoir un fort potentiel en tant qu'agent émulsifiant. Leur capacité émulsifiante (CE) bien qu'en général plus faible que celle de la référence (caséinate de sodium), reste intéressante. Ces mêmes extraits protéiques, excepté le perméat, stabilisent mieux les émulsions que le caséinate et il serait possible d'intégrer les concentrats obtenus par ultrafiltration en l'état dans une formulation alimentaire ou cosmétique.

Pour la forme rouge de *H. pluvialis*, l'extraction des composés d'intérêts a nécessité un broyage plus poussé avec 2 passages à 2,7 kbar. Les deux produits de broyage, surnageant et culot ont fait l'objet d'études d'extraction / fractionnement. Le surnageant de la forme rouge, à l'instar du surnageant de la forme verte, est une matrice complexe contenant à la fois des composés liposolubles (pigments et lipides) et des molécules hydrosolubles (sucres et protéines). Afin de séparer les molécules hydrosolubles et liposolubles d'*Haematococcus pluvialis*, nous avons utilisé la floculation au PEI, qui n'avait jamais été testée sur des microalgues. Ainsi, la condition de traitement avec 0,075 % de PEI et à pH 7,4 permet la floculation de 96 % des lipides et pigments en conservant 100 % des sucres et 89 % des protéines dans la phase aqueuse. L'étude des propriétés fonctionnelles du surnageant de floculation a montré un comportement similaire à celui du surnageant de broyage non fractionné, à savoir une capacité émulsifiante importante et une bonne stabilité des émulsions formées. Par ailleurs, ce comportement est proche de ceux du surnageant de broyage de la forme verte, ainsi que du rétentat d'ultrafiltration précédemment analysés. Du point de vue économique, la faible quantité de PEI utilisée induit un coût de traitement faible, ce qui rend crédible la mise en œuvre de ce procédé dans le cadre d'une bioraffinerie.

Enfin, pour fractionner les composés liposolubles de *H. pluvialis* rouge nous avons testé la chromatographie de partage centrifuge (CPC) associée au système bi-phasique heptane : méthanol (+ 2 % eau). Ces premiers pas dans le fractionnement des composés lipidiques de *H. pluvialis* ont été assez concluants. En effet le système heptane : méthanol (+ 2 % eau) utilisé en Dual Mode a permis de purifier le pigment ayant la plus grande valeur ajoutée: l'astaxanthine. De fait, 90 % de l'astaxanthine estérifiée est retrouvée dans une fraction d'heptane éluee dans la phase 2 du Dual mode. Les lipides ont été conservés à 90 % mais avec une majorité collectée dans l'heptane dès le changement de mode. Le profil d'acide gras est resté identique à celui de l'extrait initial, mais avec moins de pigments, il s'agit donc bien d'un fractionnement des lipides et pigments. La mise en œuvre de la CPC, même si le procédé doit encore être optimisé, a permis de lever le principal verrou technologique de la bioraffinerie d'*Haematococcus pluvialis*.

Les résultats obtenus nous permettent d'établir un enchaînement de procédés qui permettrait d'extraire, de fractionner / purifier les composés d'intérêts de *H. pluvialis* rouge (Figure 58). Ce schéma de bioraffinerie reporte la distribution des différentes fractions, lipides, pigments, sucres et protéines lors des procédés de lyse et d'extraction, sur la base des expériences menées indépendamment mais sur un lot unique de biomasse. Malheureusement par manque de temps,

ce schéma n'a pas pu être mis en œuvre sous la forme d'une seule expérience intégrée permettant de le valider par des bilans matière.

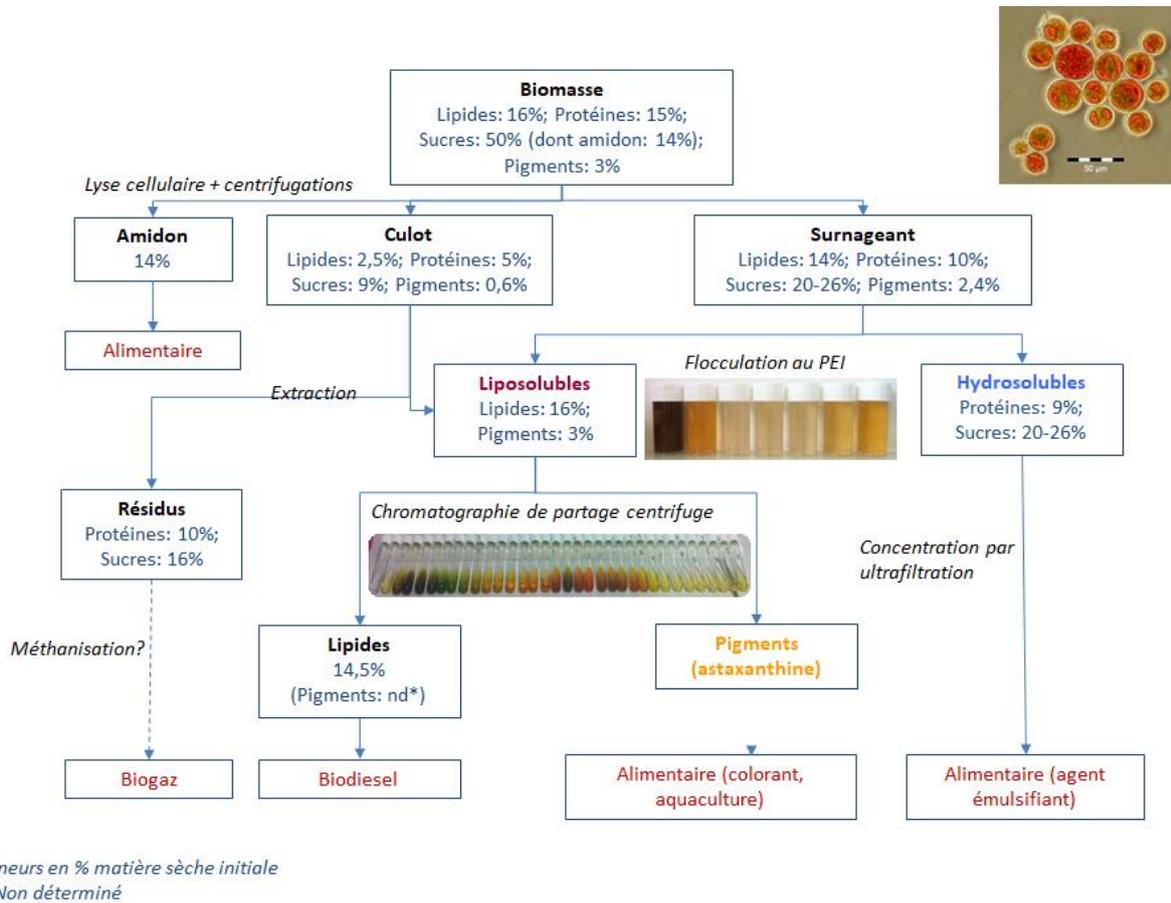


Figure 58 Proposition de schéma intégré pour la bioraffinerie de *H. pluvialis rouge*.

Les lipides, bien que partiellement purifiés, ont le profil des matières premières utilisées pour la production de biodiesel avec la présence majoritaire de TAG. La présence de pigments résiduels, principalement de la chlorophylle à faible valeur ajoutée, n'est pas un frein à leur utilisation. En parallèle, nous avons pu obtenir une fraction d'astaxanthine d'un niveau de pureté beaucoup plus élevé que ce qui est actuellement commercialisé. En ce qui concerne la fraction hydrosoluble, il n'a pas été possible de séparer les protéines et les sucres par les méthodes testées. Néanmoins, la caractérisation de ces sucres n'a pas montré la présence de polysaccharides valorisables alors que la matrice protéines + sucres présente un fort potentiel en temps qu'agent émulsifiant. Il ne semble donc pas souhaitable de chercher un procédé de fractionnement efficace, qui ajoutera un coût de traitement, sans apporter de valeur supplémentaire. Enfin, il reste une fraction dont la valorisation n'a pas été étudiée : le culot de broyage après extraction des lipides et pigments, qui contient encore une quantité non négligeable de sucres et de protéines non solubles. Plusieurs scénarios pourraient être envisagés,

parmi lesquels la dégradation par des microorganismes anaérobies (méthanisation ou fermentation sombre) pour la production de biogaz ou de biohydrogène. Enfin, tous ces procédés sont extrapolables à un niveau industriel mais ce changement d'échelle nécessitera évidemment des ajustements. Un bilan économique complet, incluant une étude du cycle de vie, devra également être réalisé pour valider les procédés choisis.

Les perspectives à ce travail peuvent donc être divisées en deux catégories. Dans la première catégorie il s'agira :

- D'effectuer un broyage à plus grande échelle et tester concrètement l'enchaînement de procédés sur le même échantillon de départ afin d'effectuer un bilan matière complet.
- De tester la floculation au PEI à partir du polymère fixé sur des billes de silice. L'utilisation de ce dispositif permettrait une séparation par décantation au lieu d'une centrifugation, ce qui réduirait les coûts. En outre, la possibilité de réutilisation du PEI pour plusieurs cycles doit être évaluée.
- De tester la CPC à plus grand volume. Ce scale-up devrait permettre d'être plus précis dans l'évaluation de ce procédé et peut être de récupérer de l'astaxanthine encore plus purifiée. Un travail d'optimisation de la séparation en faisant varier les paramètres opératoires (vitesse de rotation et débit) devra être conduit.
- D'établir un bilan économique complet, incluant une étude du cycle de vie.

Dans la deuxième catégorie de perspectives, plus lointaines, il serait intéressant d'inclure la standardisation des conditions de culture à la bioraffinerie. En effet, afin d'assurer les performances et la répétabilité de la bioraffinerie, il est important qu'il n'y ait pas trop de variations dans la composition de la biomasse. Enfin, certaines techniques n'avaient jamais été mises en œuvre auparavant mais semblent extrapolables à d'autres souches de microalgues. Il serait par exemple intéressant de tester la floculation au PEI ou la séparation des composés liposolubles sur des fractions issues d'autres souches, afin de mieux comprendre les phénomènes mis en jeu. Ainsi, on pourrait imaginer disposer d'un éventail de procédés de fractionnement adaptés à la nature des composés à séparer, et de choisir un enchaînement performant par la simple analyse de la composition de la biomasse.

Références bibliographiques

- Alvarez, J.G., Cazes, J., Touchstone, J.C., Grob, R.L., 1990. Isolation and Purification of Lipids by Centrifugal Partition Chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* 13, 3603–3614.
- Anand, H., Balasundaram, B., Pandit, A.B., Harrison, S.T.L., 2007. The effect of chemical pretreatment combined with mechanical disruption on the extent of disruption and release of intracellular protein from *E. coli*. *Biochem. Eng. J.* 35, 166–173.
- Ansari, F.A., Shriwastav, A., Gupta, S.K., Rawat, I., Guldhe, A., Bux, F., 2015. Lipid extracted algae as a source for protein and reduced sugar: A step closer to the biorefinery. *Bioresour. Technol.* 179, 559–564.
- Andersson, M.M., Breccia, J.D., Hatti-Kaul, R., 2000. Stabilizing effect of chemical additives against oxidation of lactate dehydrogenase. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 32, 145–153.
- Banerjee, A., Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C., 2002. *Botryococcus braunii*: A Renewable Source of Hydrocarbons and Other Chemicals. *Crit. Rev. Biotechnol.* 22, 245–279.
- Barsanti, L., Gualtieri, P., 2014. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. CRC press.
- Batista, A.P., Gouveia, L., Bandarra, N.M., Franco, J.M., Raymundo, A., 2013. Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. *Algal Res.* 2, 164–173.
- Batista, A.P., Nunes, M.C., Raymundo, A., Gouveia, L., Sousa, I., Cordobés, F., Guerrero, A., Franco, J.M., 2011. Microalgae biomass interaction in biopolymer gelled systems. *Food Hydrocoll., Food Colloids 2010: On the Road from Interfaces to Consumers* 25, 817–825.
- Becker, E.W., 2007. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnol. Adv.* 25, 207–210.
- Bellou, S., Baeshen, M.N., Elazzazy, A.M., Aggeli, D., Sayegh, F., Aggelis, G., 2014. Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. *Biotechnol. Adv.* 32, 1476–1493.
- Benelhadj, S., Fejji, N., Degraeve, P., Attia, H., Ghorbel, D., Gharsallaoui, A., 2016. Properties of lysozyme/*Arthrospira platensis* (*Spirulina*) protein complexes for antimicrobial edible food packaging. *Algal Res.* 15, 43–49.
- Bermejo, R., Talavera, E.M., Alvarez-Pez, J.M., 2001. Chromatographic purification and characterization of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*: Semi preparative high-performance liquid chromatographic separation and characterization of its subunits. *J. Chromatogr. A* 917, 135–145.
- Bermejo Román, R., Álvarez-Pez, J.M., Ación Fernández, F.G., Molina Grima, E., 2002. Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. *J. Biotechnol.* 93, 73–85.
- Berthod, A., Armstrong, D.W., 1988. Centrifugal Partition Chromatography. I. General Features. *J. Liq. Chromatogr.* 11, 547–566.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917.
- Boer, K. de, Moheimani, N.R., Borowitzka, M.A., Bahri, P.A., 2012. Extraction and conversion pathways for microalgae to biodiesel: a review focused on energy consumption. *J. Appl. Phycol.* 24, 1681–1698.
- Bondioli, P., Della Bella, L., Rivolta, G., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Rodolfi, L., Casini, D., Prussi, M., Chiaramonti, D., Tredici, M.R., 2012. Oil production by the marine microalgae *Nannochloropsis* sp. F&M-M24 and *Tetraselmis suecica* F&M-M33. *Bioresour. Technol.* 114, 567–572.
- Borthwick, K.A.J., Coakley, W.T., McDonnell, M.B., Nowotny, H., Benes, E., Gröschl, M., 2005. Development of a novel compact sonicator for cell disruption. *J. Microbiol. Methods* 60, 207–216.
- Bousquet, O., Le Goffic, F., 1995. Counter-current chromatographic separation of polyunsaturated fatty acids. *J. Chromatogr. A* 704, 211–216.

- Boussiba, S., 2000. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. *Physiol. Plant.* 108, 111–117.
- Boussiba, S., Ben G.U., N., Fan, L., Vonshak, A., 1992. Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green alga *Haematococcus pluvialis*. *Methods Enzymol.* USA.
- Boussiba, S., Vonshak, A., 1991. Astaxanthin Accumulation in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Cell Physiol.* 32, 1077–1082.
- Brányiková, I., Maršáľková, B., Doucha, J., Brányik, T., Bišová, K., Zachleder, V., Vítová, M., 2011. Microalgae novel highly efficient starch producers. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 766–776.
- Brennan, L., Owende, P., 2010. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14, 557–577.
- Brown, M.R., 1991. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 145, 79–99.
- Burgess, R.R., 2009. Protein precipitation techniques. *Methods Enzymol.* 463, 331–342.
- Burgess, R.R., 1991. Use of polyethyleneimine in purification of DNA-binding proteins, in: *Enzymology*, B.M. in (Ed.), *Protein \3- DNA Interactions*. Academic Press, pp. 3–10.
- Campo, J.A.D., García-González, M., Guerrero, M.G., 2007. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74, 1163–1174.
- Cavonius, L.R., Albers, E., Undeland, I., 2015. pH-shift processing of *Nannochloropsis oculata* microalgal biomass to obtain a protein-enriched food or feed ingredient. *Algal Res.* 11, 95–102.
- Chacón-Lee, T., González-Mariño, G. E., 2010. Microalgae for “Healthy” Foods-Possibilities and Challenges. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 9, 655–675.
- Chen, B.; You, B.; Huang, J.; Yu, Y.; Chen, W., 2010. Isolation and antioxidant property of the extracellular polysaccharide from *Rhodella reticulata*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 26, 833–840.
- Chen, F., Li, H. B., Wong, R.N.S., Ji, B., Jiang, Y., 2005. Isolation and purification of the bioactive carotenoid zeaxanthin from the microalga *Microcystis aeruginosa* by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* 1064, 183–186.
- Chen M., Tanga, H., Maa, H., Holland, T. C., Nga K. Y. S., Salley S. O. 2011. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology* 102: 1649-1955.
- Chen, C., Zhao, X., Yen, H., Ho, S., Cheng, C., Lee, D., Bai, F., Chang, J., 2013. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochem. Eng. J.* 78, 1-10.
- Chen, Y. H., Chang, G. K., Kuo, S. M., Huang, S.Y., Hu, I. C., Lo, Y. L., Shih, S. R., 2016. Well-tolerated *Spirulina* extract inhibits influenza virus replication and reduces virus-induced mortality. *Sci. Rep.* 6, 24253.
- Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25, 294–306.
- Chisti, Y., 2008. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol.* 26, 126–131.
- Choi, I., Choi, S.J., Chun, J.K., Moon, T.W., 2006. Extraction Yield of Soluble Protein and Microstructure of Soybean Affected by Microwave Heating. *J. Food Process. Preserv.* 30, 407–419.
- Choplin, L., Marchal, P., Sadtler, V., Della Valle, D., 2006. Emulsification. In: Colonna, P., Della Valle, D. (Eds.), *Mise en œuvre des matières agroalimentaires 1*. Lavoisier, Paris, pp. 190–302

- Ciron, C.I.E., Gee, V.L., Kelly, A.L., Auty, M.A.E., 2011. Effect of microfluidization of heat-treated milk on rheology and sensory properties of reduced fat yoghurt. *Food Hydrocoll.* 25, 1470–1476.
- Contreras, R., Paniagua-Michel, J., Olmos, J., 2015. Identification of microalgae producers of commercially important compounds. In: *Marine algae extracts: processes, products and applications*, Chapter 3, Kim, S-K., Chojnacka, K., Eds., Wiley editions.
- Converti, A., Casazza, A.A., Ortiz, E.Y., Perego, P., Del Borghi, M., 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* 48, 1146–1151.
- Costa, D.F.A., Isherwood, P.I., McLennan, S.R., Poppi, D.P., Quigley, S.P., 2010. Chemical composition and In vitro degradability of various algae species and protein supplements commonly fed to ruminants. *Anim. Prod. Aust.* 28, 61–61.
- Dahiya, A., 2014. *Bioenergy: Biomass to Biofuels*. Academic Press.
- Damiani, M.C., Popovich, C.A., Constenla, D., Leonardi, P.I., 2010. Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as a biodiesel feedstock. *Bioresour. Technol.* 101, 3801–3807.
- Damodaran, S., 2005. Protein Stabilization of Emulsions and Foams. *J. Food Sci.* 70, R54–R66.
- Damodaran, S., 1996 *Amino Acids, Peptides and Proteins*. In: Fennema, R.O., *Food Chemistry*, 3rd Edition, CRC Press, New York, 321-416.
- De Jesus Raposo, M.F., de Moraes, R.M.S.C., de Moraes, A.M.M.B., 2013. Bioactivity and Applications of Sulphated Polysaccharides from Marine Microalgae. *Mar. Drugs* 11, 233–252.
- De Philippis, R., Sili, C., Vincenzini, M., 1992. Glycogen and polyhydroxybutyrate synthesis in *Spirulina maxima*. *J. Gen. Microbiol.* 138, 1623–1628.
- De Philippis, R., Vincenzini, M., 1998. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiol. Rev.* 22, 151–175.
- De Reviere B. 2003. *Biologie et phylogénie des algues*. Belin (Eds). Tome 1 : 1-352 et 2 : 1-256.
- Delannay, E., Toribio, A., Boudesocque, L., Nuzillard, J.M., Zèches-Hanrot, M., Dardennes, E., Le Dour, G., Sapi, J., Renault, J.H., 2006. Multiple dual-mode centrifugal partition chromatography, a semi-continuous development mode for routine laboratory-scale purifications. *J. Chromatogr. A* 1127, 45–51.
- Delattre, C., Pierre, G., Laroche, C., Michaud, P., 2016. Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. *Biotechnology advances*, 34 (7): 1159-1179.
- Dickinson, E., Stainsby, G., 1982. *Colloids in Food*. Applied Science Publishers, London.
- Dodgson, K.S., Price, R.G., 1962. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochem. J.* 84, 106–110.
- Dong, S., Huang, Y., Zhang, R., Wang, S., Liu, Y., 2014. Four Different Methods Comparison for Extraction of Astaxanthin from Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *Sci. World J.*
- Doucha, J., Lívanský, K., 2008. Influence of processing parameters on disintegration of *Chlorella* cells in various types of homogenizers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 431–440.
- Dragone, G., Fernandes, B.D., Abreu, A.P., Vicente, A.A., Teixeira, J.A., 2011. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. *Appl. Energy*, Special Issue of Energy from algae: Current status and future trends 88, 3331–3335.
- Encarnação T., Burrows H.D., Pais A.C., Campos M.G., Kremer A. 2012. Effect of N and P on the Uptake of Magnesium and Iron and on the Production of Carotenoids and

- Chlorophyll by the Microalgae *Nannochloropsis* sp. J. Agri. Sci. Technol. A 2 (2012) 824-832
- Eze, J.M.O., Dumbroff, E.B., 1982. A comparison of the Bradford and Lowry methods for the analysis of protein in chlorophyllous tissue. *Can. J. Bot.* 60, 1046–1049.
- Fernandes, H.L., Tomé, M.M., Lupi, F.M., Fialho, A.M., Sá-Correia, I., Novais, J.M., 1989. Biosynthesis of high concentrations of an exopolysaccharide during the cultivation of the microalga *Botryococcus braunii*. *Biotechnol. Lett.* 11, 433–436.
- Fernando, S., Adhikari, S., Chandrapal, C., Murali, N., 2006. Biorefineries: Current Status, Challenges, and Future Direction. *Energy Fuels* 20, 1727–1737.
- Fenoradosoa, A., 2009. Caractérisation des polysaccharides extraits d'algues de Madagascar: *Halymenia durvillei* (rhodophycées) et *Sargassum turbinaroides* (Phéophycées). Thèse de doctorat de l'Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand.
- Food and Agriculture Organization, 1991, Protein Quality Evaluation. Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation. Food and Nutrition Paper No. 51. FAO, Rome.
- Geresh, S., Mamontov, A., Weinstein, J., 2002. Sulfation of extracellular polysaccharides of red microalgae: preparation, characterization and properties. *J. Biochem. Biophys. Methods* 50, 179–187.
- Glazer, A.N., Cohen-Bazire, G., 1971. Subunit Structure of the Phycobiliproteins of Blue-Green Algae. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 68, 1398–1401.
- Goettel, M., Eing, C., Gusbeth, C., Straessner, R., Frey, W., 2013. Pulsed electric field assisted extraction of intracellular valuables from microalgae. *Algal Res.* 2, 401–408.
- González-Delgado, Á. D., Kafarov, V., 2011. MICROALGAE BASED BIOREFINERY: ISSUES TO CONSIDER. *CTF - Cienc. Tecnol. Futuro* 4, 5–22.
- González-Fernández, C., Ballesteros, M., 2012. Linking microalgae and cyanobacteria culture conditions and key-enzymes for carbohydrate accumulation. *Biotechnol. Adv.*, Special issue on ACB 2011 30, 1655–1661.
- Gorain P.C., Bagchi S.k., Mallick N., 2013. Effects of calcium, magnesium and sodium chloride in enhancing lipid accumulation in two green microalgae. *Environmental Technology* 34: 1887-1894.
- Gouveia, L., Sousa, I., Batista, A.P., Raymundo, A., Bandararra, N.M., 2008. Microalgae in novel food products. *Food Chem. Res. Dev.*, 75–112.
- Grimi, N., Dubois, A., Marchal, L., Jubeau, S., Lebovka, N.I., Vorobiev, E., 2014. Selective extraction from microalgae *Nannochloropsis* sp. using different methods of cell disruption. *Bioresour. Technol.* 153, 254–259.
- Gu, W., Xie, X., Gao, S., Zhou, W., Pan, G., Wang, G., 2013. Comparison of Different Cells of *Haematococcus pluvialis* Reveals an Extensive Acclimation Mechanism during its Aging Process: From a Perspective of Photosynthesis. *PLOS ONE* 8, e67028.
- Guedes, A.C., Amaro, H.M., Malcata, F.X., 2011. Microalgae as Sources of Carotenoids. *Mar. Drugs* 9, 625–644.
- Günerken, E., D'Hondt, E., Eppink, M.H.M., Garcia-Gonzalez, L., Elst, K., Wijffels, R.H., 2015. Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnol. Adv.* 33, 243–260.
- Gupta, V., Nath, S., Chand, S., 2000. Estimation of proteins in the presence of polyethylenimine. *Biotechnol. Lett.* 22, 927–929.
- Guschina, I.A., Harwood, J.L., 2006. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog. Lipid Res.* 45, 160–186.
- Guzman-Murillo, M.A., Ascencio, F., 2000. Anti-adhesive activity of sulphated exopolysaccharides of microalgae on attachment of red sore disease-associated bacteria and helicobacter pylori to tissue culture cells. *Lett. Appl. Microbiol.* 30, 473–478.

- Guzman, S., Gato, A., Lamela, M., Freire-Garabal, M., Calleja, J.M., 2003. Anti-Inflammatory and immunomodulatory activities of polysaccharide from *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytother. Res.* 17, 665.
- Hagen, C., Grünewald, K., Schmidt, S., Müller, J., 2000. Accumulation of secondary carotenoids in flagellates of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) is accompanied by an increase in per unit chlorophyll productivity of photosynthesis. *Eur. J. Phycol.* 35, 75–82.
- Hagen, C., Siegmund, S., Braune, W., 2002. Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation. *Eur. J. Phycol.* 37, 217–226.
- Harun, R., Danquah, M.K., 2011. Enzymatic hydrolysis of microalgal biomass for bioethanol production. *Chem. Eng. J.* 168, 1079–1084.
- Harun, R., Singh, M., Forde, G.M., Danquah, M.K., 2010. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14, 1037–1047.
- Hauvermale, A., Kuner, J., Rosenzweig, B., Guerra, D., Diltz, S., Metz, J.G., 2006. Fatty acid production in *Schizochytrium* sp.: Involvement of a polyunsaturated fatty acid synthase and a type I fatty acid synthase. *Lipids* 41, 739–747.
- Hays V.W., Swenson M.J., 1985. Minerals and Bones. In: *Dukes' Physiology of Domestic Animals*, Tenth Edition pp. 449-466.
- Hermans-Lokkerbol, A.C.J., Hoek, A.C., Verpoorte, R., 1997. Preparative separation of bitter acids from hop extracts by centrifugal partition chromatography. *J. Chromatogr. A* 771, 71–79.
- Herrero, M., Cifuentes, A., Ibañez, E., 2006. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. *Food Chem.* 98, 136–148.
- Hillen, L.W., Pollard, G., Wake, L.V., White, N., 1982. Hydrocracking of the oils of *Botryococcus braunii* to transport fuels. *Biotechnol. Bioeng.* 24, 193–205.
- Ho, S. H., Huang, S. W., Chen, C. Y., Hasunuma, T., Kondo, A., Chang, J. S., 2013. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. *Bioresour. Technol., Biorefineries* 135, 191–198.
- Ho, S.Y., Mittal, G.S., 1996. Electroporation of Cell Membranes: A Review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 16, 349–362.
- Holtin, K., Kuehnle, M., Rehbein, J., Schuler, P., Nicholson, G., Albert, K., 2009. Determination of astaxanthin and astaxanthin esters in the microalgae *Haematococcus pluvialis* by LC-(APCI)MS and characterization of predominant carotenoid isomers by NMR spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* 395, 1613–1622.
- Hong, M.E., Hwang, S.K., Chang, W.S., Kim, B.W., Lee, J., Sim, S.J., 2015. Enhanced autotrophic astaxanthin production from *Haematococcus pluvialis* under high temperature via heat stress-driven Haber–Weiss reaction. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 5203–5215.
- Horrocks, L.A., Yeo, Y.K., 1999. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacol. Res.* 40, 211–225.
- Hosikian, A., Lim, S., Halim, R., Danquah, M.K., 2010. Chlorophyll Extraction from Microalgae: A Review on the Process Engineering Aspects. *Int. J. Chem. Eng.* 2010, e391632.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A., 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 54, 621–639.

- Hu, Q., 2004. 5 Environmental Effects on Cell Composition. In: Richmond, A. (ed.), Handbook of microalgal culture. biotechnology and applied phycology, John Wiley & Sons, Aimes, 83-94.
- Huheihel, M., Ishanu, V., Tal, J., Arad, S.M., 2002. Activity of *Porphyridium* sp. polysaccharide against herpes simplex viruses in vitro and in vivo. J. Biochem. Biophys. Methods 50, 189–200.
- Ito, Y., 2005. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. J. Chromatogr. A 1065, 145–168.
- Janczyk, P., Wolf, C., Souffrant, W. B., 2005. Evaluation of nutritional value and safety of the green microalgae *Chlorella vulgaris* treated with novel processing methods. Arch Zootech, 8, 132-147.
- Jerôme, F., Chimie verte: définition, objectifs et exemples d'applications « Chimie durable ». 4th international symposium on green chemistry- La Rochelle-16-19 Mai 2017;
- Jiang, J., Chen, J., Xiong, Y.L., 2009. Structural and emulsifying properties of soy protein isolate subjected to acid and alkaline pH-shifting processes. J. Agric. Food Chem. 57, 7576–7583.
- Jiang, Y., Chen, F., Liang, S. Z., 1999. Production potential of docosahexaenoic acid by the heterotrophic marine dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii*. Process Biochem. 34, 633–637.
- Jin, E., Polle, J. E., Lee, H. K., Hyun, S. M., Chang, M., 2003. Xanthophylls in microalgae: from biosynthesis to biotechnological mass production and application. J. Microbiol. Biotechnol. , 13(2), 165-174.
- Ju, Z.Y., Deng, D. F., Dominy, W., 2012. A defatted microalgae (*Haematococcus pluvialis*) meal as a protein ingredient to partially replace fishmeal in diets of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931). Aquaculture 354–355, 50–55.
- Jump, D.B., Clarke, S.D., Thelen, A., Liimatta, M., 1994. Coordinate regulation of glycolytic and lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. J. Lipid Res. 35, 1076–1084.
- Karamanos, Y., Kol, O., Wieruszkeski, J. M., Strecker, G., Fournet, B., Zalisz, R., 1992. Structure of the O-specific polysaccharide chain of the lipopolysaccharide of *Enterobacter agglomerans*. Carbohydr. Res. 231, 197–204.
- Kato, T., Miyagawa, A., Kasuya, M.C.Z., Ito, A., Hatanaka, K., 2008. Purification by centrifugal partition chromatography of amphiphilic compounds, glycolipids and pseudo-glycolipids synthesized by using cells. J. Chromatogr. A 1178, 154–159.
- Kim, S.M., Shang, Y.F., Um, B. H., 2011. A preparative method for isolation of fucoxanthin from *Eisenia bicyclis* by centrifugal partition chromatography. Phytochem. Anal. 22, 322–329.
- Kim, Y. H., Choi, Y. K., Park, J., Lee, S., Yang, Y. H., Kim, H.J., Park, T. J., Hwan Kim, Y., Lee, S.H., 2012. Ionic liquid-mediated extraction of lipids from algal biomass. Bioresour. Technol., Special Issue: Innovative Researches on Algal Biomass 109, 312–315.
- Kobayashi, M., Kurimura, Y., Kakizono, T., Nishio, N., Tsuji, Y., 1997. The Society for Fermentation and Bioengineering Morphological changes in the life cycle of the green alga *Haematococcus pluvialis*. J. Ferment. Bioeng. 84, 94–97.
- Krinsky, N.I., 1963. A relationship between partition coefficients of carotenoids and their functional groups. Anal. Biochem. 6, 293–302.
- Krinsky, N.I., Goldsmith, T.H., 1960. The carotenoids of the flagellated alga, *Euglena gracilis*. Arch. Biochem. Biophys. 91, 271–279.

- Kornprobst, J.M., 2005. Substances naturelles d'origine marine: chimiodiversité, pharmacodiversité, biotechnologies. In: Kornprobst, J.M. (Eds.). France, Paris, Tec & Doc, 1830 p
- Lapuerta, M., Armas, O., Rodríguez-Fernández, J., 2008. Effect of biodiesel fuels on diesel engine emissions. *Prog. Energy Combust. Sci.* 34, 198–223.
- Lau, C. S., Bunnell, K.A., Clausen, E.C., Thoma, G. J., Lay, J.O., Gidden, J., Carrier, D.J., 2010. Separation and purification of xylose oligomers using centrifugal partition chromatography. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 363–370.
- Lee, A.K., Lewis, D.M., Ashman, P.J., 2012. Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements. *Biomass Bioenergy, International Conference on Lignocellulosic ethanol* 46, 89–101.
- Lee, J. H., Ko, J. Y., Oh, J. Y., Kim, C. Y., Lee, H. J., Kim, J., Jeon, Y. J., 2014. Preparative isolation and purification of phlorotannins from *Ecklonia cava* using centrifugal partition chromatography by one-step. *Food Chem.* 158, 433–437.
- Lee, J. Y., Yoo, C., Jun, S. Y., Ahn, C. Y., Oh, H. M., 2010. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresour. Technol., Supplement Issue on Recent Developments of Biomass Conversion Technologies* 101, S75–S77.
- Li, H., Li, Z., Xiong, S., Zhang, H., Li, N., Zhou, S., Liu, Y., Huang, Z., 2011. Pilot-scale isolation of bioactive extracellular polymeric substances from cell-free media of mass microalgal cultures using tangential-flow ultrafiltration. *Process Biochem.* 46, 1104–1109.
- Li, J., Zhu, D., Niu, J., Shen, S., Wang, G., 2011. An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol. Adv.* 29, 568–574.
- Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C., 2001. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy, in: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc.
- Lin, H.M., Yang, Z., Chen, L.F., 1992. An improved method for disruption of microbial cells with pressurized carbon dioxide. *Biotechnol. Prog.* 8, 165–166.
- López, M. C. G. M., Sánchez, E. D. R., López, J. L. C., Fernández, F. G. A., Sevilla, J. M. F., Rivas, J., Guerrero, M. G., Grima, E. M., 2006. Comparative analysis of the outdoor culture of *Haematococcus pluvialis* in tubular and bubble column photobioreactors. *J. Biotechnol.* 123, 329–342.
- Lorenz, R.T., 1999. A technical review of *Haematococcus* algae. *NatuRose™*
- Lorenz, R.T., Cysewski, G.R., 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnol.* 18, 160–167.
- Louaisil, N., Pham, P.D., Boeda, F., Faye, D., Castanet, A., Legoupy, S., 2011. Ionic Liquid Supported Organotin Reagents: Green Tools for Stille CrossCoupling Reactions with Brominated Substrates. *Eur. J. Org. Chem.*, 143–149.
- Lourenço, S.O., Barbarino, E., De-Paula, J.C., Pereira, L.O. da S., Marquez, U.M.L., 2002. Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds. *Phycol. Res.* 50, 233–241.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Malhotra V.K., 1998. *Biochemistry for Students*. Tenth Edition. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd, New Delhi, India
- Marcati, A., Ursu, A.V., Laroche, C., Soanen, N., Marchal, L., Jubeau, S., Djelveh, G., Michaud, P., 2014. Extraction and fractionation of polysaccharides and B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum* by membrane technology. *Algal Res.* 5, 258–263.

- Marchal, L., Foucault, A., Patissier, G., Rosant, J.M., Legrand, J., 2000. Influence of flow patterns on chromatographic efficiency in centrifugal partition chromatography. *J. Chromatogr. A* 869, 339–352.
- Marchal, L., Intes, O., Foucault, A., Legrand, J., Nuzillard, J. M., Renault, J.-H., 2003a. Rational improvement of centrifugal partition chromatographic settings for the production of 5-n-alkylresorcinols from wheat bran lipid extract: I. Flooding conditions optimizing the injection step. *J. Chromatogr. A* 1005, 51–62.
- Marchal, L., Legrand, J., Foucault, A., 2003b. Centrifugal partition chromatography: A survey of its history, and our recent advances in the field. *Chem. Rec.* 3, 133–143.
- Marchal, L., Mojaat-Guemir, M., Foucault, A., Pruvost, J., 2013. Centrifugal partition extraction of β -carotene from *Dunaliella salina* for efficient and biocompatible recovery of metabolites. *Bioresour. Technol.* 134, 396–400.
- Markou, G., Angelidaki, I., Georgakakis, D., 2012. Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 631–645.
- Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S., 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14, 217–232.
- 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.* 2003, 104, 13–22.
- Mazzaferro, L., Breccia, J.D., Andersson, M.M., Hitzmann, B., Hatti-Kaul, R., 2010. Polyethyleneimine–protein interactions and implications on protein stability. *Int. J. Biol. Macromol.* 47, 15–20.
- McCleary, B.V., 2007. An integrated procedure for the measurement of total dietary fibre (including resistant starch), non-digestible oligosaccharides and available carbohydrates. *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 291–308.
- McCleary, B. V., Gibson, T. S., Solah, V. and Mugford, D. C. 1994. Total Starch Measurement in Cereal Products: Interlaboratory Evaluation of a Rapid Enzymic Test Procedure. *Cereal Chemistry*, 71, 501-505
- Mckenzie, H.A., White Jr., F.H., 1991. Lysozyme and α -Lactalbumin: Structure, Function, and Interrelationships, in: C.B. Anfinsen, F.M.R., John T. Edsall and David S. Eisenberg (Ed.), *Advances in Protein Chemistry*. Academic Press, pp. 173–315.
- Mendes, R.L., Nobre, B.P., Cardoso, M.T., Pereira, A.P., Palavra, A.F., 2003. Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. *Inorganica Chim. Acta, Protagonists in Chemistry*, Frausto Da Silva 356, 328–334.
- Mendes-Pinto, M.M., Raposo, M.F.J., Bowen, J., Young, A.J., Morais, R., 2001. Evaluation of different cell disruption processes on encysted cells of *Haematococcus pluvialis*: effects on astaxanthin recovery and implications for bio-availability. *J. Appl. Phycol.* 13, 19–24.
- Metzger, P., Largeau, C., 2005. *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 486–496.
- Miao, F., Lu, D., Li, Y., Zeng, M., 2006. Characterization of astaxanthin esters in *Haematococcus pluvialis* by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 352, 176–181.
- Mihova, S.G., Georgiev, D.I., Minkova, K.M., Tchernov, A.A., 1996. Phycobiliproteins in *Rhodella reticulata* and photoregulatory effects on their content. *J. Biotechnol.* 48, 251–257.

- Milburn, P., Bonnerjea, J., Hoare, M., Dunnill, P., 1990. Selective flocculation of nucleic acids, lipids, and colloidal particles from a yeast cell homogenate by polyethyleneimine, and its scale-up. *Enzyme Microb. Technol.* 12, 527–532.
- Miranda, J.R., Passarinho, P.C., Gouveia, L., 2012. Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production. *Bioresour. Technol.* 104, 342–348.
- Mishra, A., Kavita, K., Jha, B., 2011. Characterization of extracellular polymeric substances produced by micro-algae *Dunaliella salina*. *Carbohydr. Polym.* 83, 852–857.
- Molina Grima, E., Belarbi, E.H., Ación Fernández, F.G., Robles Medina, A., Chisti, Y., 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnol. Adv.* 20, 491–515.
- Monsigny, M., Petit, C., Roche, A.C., 1988. Colorimetric determination of neutral sugars by a resorcinol sulfuric acid micromethod. *Anal. Biochem.* 175, 525–530.
- Montsant, A., Zarka, A., Boussiba, S., 2001. Presence of a nonhydrolyzable biopolymer in the cell wall of vegetative cells and astaxanthin-rich cysts of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Mar. Biotechnol. N. Y.* N 3, 515–521.
- Morrison, W.R., Smith, L.M., 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride–*méthanol*. *J. Lipid Res.* 5, 600–608.
- Mourente, G., Lubián, L.M., Odriozola, J.M., 1990 Total fatty acid composition as a taxonomic index of some marine microalgae used as food in marine aquaculture. *Hydrobiologia* 203, 147–154.
- Mulchandani, K., Kar, J.R., Singhal, R.S., 2015. Extraction of Lipids from *Chlorella saccharophila* Using High-Pressure Homogenization Followed by Three Phase Partitioning. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 176, 1613–1626.
- Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W., 2000. Harper's Biochemistry, 25th Edition, McGraw-Hill, Health Profession Division, USA.
- Naik, S.N., Goud, V.V., Rout, P.K., Dalai, A.K., 2010. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14, 578–597.
- Natrah, F.M.I., Yusoff, F.M., Shariff, M., Abas, F., Mariana, N.S., 2007. Screening of Malaysian indigenous microalgae for antioxidant properties and nutritional value. *J. Appl. Phycol.* 19, 711–718.
- Nguyen, R.T., Harvey, H.R., 2003. Preservation via macromolecular associations during *Botryococcus braunii* decay: proteins in the Pula Kerogen. *Org. Geochem.* 34, 1391–1403.
- Pan, X., Niu, G., Liu, H., 2002. Comparison of microwave-assisted extraction and conventional extraction techniques for the extraction of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza* bunge. *Biochem. Eng. J.* 12, 71–77.
- Park, S., Kazlauskas, R.J., 2003. Biocatalysis in ionic liquids – advantages beyond green technology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 432–437.
- Park, J.K., Kim, Z.-H., Lee, C.G., Synytsya, A., Jo, H.S., Kim, S.O., Park, J.W., Park, Y.I., 2011. Characterization and immunostimulating activity of a water-soluble polysaccharide isolated from *Haematococcus lacustris*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 16, 1090–1098.
- Parniakov, O., Barba, F.J., Grimi, N., Marchal, L., Jubeau, S., Lebovka, N., Vorobiev, E., 2015. Pulsed electric field and pH assisted selective extraction of intracellular components from microalgae *Nannochloropsis*. *Algal Res.* 8, 128–134.
- Patel, A., Mishra, S., Pawar, R., Ghosh, P.K., 2005. Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. *Protein Expr. Purif.* 40, 248–255.

- Patel, A.K., Laroche, C., Marcati, A., Ursu, A.V., Jubeau, S., Marchal, L., Petit, E., Djelveh, G., Michaud, P., 2013. Separation and fractionation of exopolysaccharides from *Porphyridium cruentum*. *Bioresour. Technol.*, Special Issue: IBS 2012 & Special Issue: IFIBiop 145, 345–350.
- Pearce, K.N., Kinsella, J.E., 1978. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *J. Agric. Food Chem.* 26, 716–723.
- Peled, E., Leu, S., Zarka, A., Weiss, M., Pick, U., Khozin-Goldberg, I., Boussiba, S., 2011. Isolation of a Novel Oil Globule Protein from the Green Alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Lipids* 46, 851–861.
- Petracek, F.J., Zechmeister, L., 1956. Determination of Partition Coefficients of Carotenoids as Tool in Pigment Analysis. *Anal. Chem.* 28, 1484–1485.
- Pignolet, O., Jubeau, S., Vaca-Garcia, C., Michaud, P., 2013. Highly valuable microalgae: biochemical and topological aspects. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40, 781–796.
- Pulz, O., Gross, W., 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, 635–648.
- Ramus, J., 1972. The Production of Extracellular Polysaccharide by the Unicellular Red Alga *Porphyridium Aeruginum* 1,2. *J. Phycol.* 8, 97–111.
- Rao, A.R., Dayananda, C., Sarada, R., Shamala, T.R., Ravishankar, G.A., 2007. Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresour. Technol.* 98, 560–564.
- Reboloso Fuentes, M.M., Ación Fernández, G.G., Sánchez Pérez, J.A., Guil Guerrero, J.L., 2000. Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. *Food Chem.* 70, 345–353.
- Reis, A., Mendes, A., Lobo-Fernandes, H., Empis, J.A., Novais, J.M., 1998. Production, extraction and purification of phycobiliproteins from *Nostoc* sp. *Bioresour. Technol.* 66, 181–187.
- Renault, J.H., Thepenier, P., Zeches-Hanrot, M., Foucault, A.P., 1995. Separation of the Two Major Anthocyanins from Champagne Vintage By-Products by Gradient Elution Centrifugal Partition Chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* 18, 1663–1670.
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M.R., 2009. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 100–112.
- Rodríguez-Meizoso, I., Jaime, L., Santoyo, S., Señoráns, F.J., Cifuentes, A., Ibáñez, E., 2010. Subcritical water extraction and characterization of bioactive compounds from *Haematococcus pluvialis* microalga. *J. Pharm. Biomed. Anal., Natural Bioactive Compounds and Nutrigenomics* 51, 456–463.
- Rosenberg, I.M., 2013. *Protein Analysis and Purification: Benchtop Techniques*. Springer Science & Business Media.
- Rousseau, D., Héliès-Toussaint, C., Moreau, D., Raederstorff, D., Grynberg, A., 2003. Dietary n-3 PUFAs affect the blood pressure rise and cardiac impairments in a hyperinsulinemia rat model in vivo. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 285, H1294–H1302.
- Roussel, M., Villay, A., Delbac, F., Michaud, P., Laroche, C., Roriz, D., El Alaoui, H., Diogon, M., 2015. Antimicrosporidian activity of sulphated polysaccharide from algae and their potential to control honeybee noseemis. *Carbohydr. Polym.* 133, 213–220.
- Safi, C., Charton, M., Pignolet, O., Silvestre, F., Vaca-Garcia, C., Pontalier, P.Y., 2012. Influence of microalgae cell wall characteristics on protein extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors. *J. Appl. Phycol.* 25, 523–529.
- Safi, C., Liu, D.Z., Yap, B.H.J., Martin, G.J.O., Vaca-Garcia, C., Pontalier, P.Y., 2014a. A two-stage ultrafiltration process for separating multiple components of *Tetraselmis suecica* after cell disruption. *J. Appl. Phycol.* 26, 2379–2387.

- Safi, C., Ursu, A.V., Laroche, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., Vaca-Garcia, C., 2014b. Aqueous extraction of proteins from microalgae: Effect of different cell disruption methods. *Algal Res.* 3, 61–65.
- Saha, S.K., McHugh, E., Hayes, J., Moane, S., Walsh, D., Murray, P., 2013. Effect of various stress-regulatory factors on biomass and lipid production in microalga *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour. Technol.* 128, 118–124.
- Salt, D.E., Bentham, A.C., Hay, S., Idris, A., Gregory, J., Hoare, M., Dunnill, P., 1996. The mechanism of flocculation of a *Saccharomyces cerevisiae* cell homogenate using polyethyleneimine. *Bioprocess Eng.* 15, 71–76.
- Salt, D.E., Hay, S., Thomas, O.R.T., Hoare, M., Dunnill, P., 1995. Selective flocculation of cellular contaminants from soluble proteins using polyethyleneimine: A study of several organisms and polymer molecular weights. *Enzyme Microb. Technol.* 17, 107–113.
- Samarasinghe, N., Fernando, S., Lacey, R., Faulkner, W.B., 2012. Algal cell rupture using high pressure homogenization as a prelude to oil extraction. *Renew. Energy* 48, 300–308.
- Sánchez, C.C., Patino, J.M.R., 2005. Interfacial, foaming and emulsifying characteristics of sodium caseinate as influenced by protein concentration in solution. *Food Hydrocoll., Food Colloids.*, 407–416.
- Sarada, R., Pillai, M.G., Ravishankar, G.A., 1999. Phycocyanin from *Spirulina sp.*: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Process Biochem.* 34, 795–801.
- Sarada, R., Vidhyavathi, R., Usha, D., Ravishankar, G.A., 2006. An Efficient Method for Extraction of Astaxanthin from Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7585–7588.
- Schenk, P.M., Thomas-Hall, S.R., Stephens, E., Marx, U.C., Mussnug, J.H., Posten, C., Kruse, O., Hankamer, B., 2008. Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *BioEnergy Res.* 1, 20–43.
- Schwenzfeier, A., Helbig, A., Wierenga, P.A., Gruppen, H., 2013. Emulsion properties of algae soluble protein isolate from *Tetraselmis sp.* *Food Hydrocoll.* 30, 258–263.
- Schwenzfeier, A., Wierenga, P.A., Eppink, M.H.M., Gruppen, H., 2014. Effect of charged polysaccharides on the techno-functional properties of fractions obtained from algae soluble protein isolate. *Food Hydrocoll.* 35, 9–18.
- Schwenzfeier, A., Wierenga, P.A., Gruppen, H., 2011. Isolation and characterization of soluble protein from the green microalgae *Tetraselmis sp.* *Bioresour. Technol.* 102, 9121–9127.
- Sekharam, K.M., Venkataraman, L.V., Salimath, P.V., 1989. Structural studies of a glucan isolated from blue-green alga *Spirulina platensis*. *Food Chem.* 31, 85–91.
- Selmane, D., Christophe, V., Gholamreza, D., 2010. Production and functional properties of beef lung protein concentrates. *Meat Sci.* 84, 315–322.
- Shahidi, F., 2006. *Nutraceutical and Specialty Lipids and their Co-Products*. CRC Press.
- Sheih, I.-C., Fang, T.J., Wu, T.-K., Lin, P.-H., 2010. Anticancer and antioxidant activities of the peptide fraction from algae protein waste. *J. Agric. Food Chem.* 58, 1202–1207.
- Simas-Rodrigues, C., Villela, H.D.M., Martins, A.P., Marques, L.G., Colepicolo, P., Tonon, A.P., 2015. Microalgae for economic applications: advantages and perspectives for bioethanol. *J. Exp. Bot.* 130.
- Sindayikengera, S., Xia, W., 2006. Nutritional evaluation of caseins and whey proteins and their hydrolysates from Protamex. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 7, 90–98.
- Soanen N., Da Silva E., Gardarin C., Michaud P., Laroche C., 2016. Improvement of exopolysaccharide production by *Porphyridium marinum*. *Bioresour. Technol.* 213 : 231-238.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101, 87–96.

- Stahl, W., Sies, H., 2005. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis., Carotenoids and Dietary Lipids* 1740, 101–107.
- Sutherland, I.A., 2007. Recent progress on the industrial scale-up of counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A*, 4th International Conference on Countercurrent Chromatography. 1151, 6–13.
- Tabarsa, M., Rezaei, M., Ramezanzpour, Z., Waaland, J.R., 2012. Chemical compositions of the marine algae *Gracilaria salicornia* (Rhodophyta) and *Ulva lactuca* (Chlorophyta) as a potential food source. *J. Sci. Food Agric.* 92, 2500–2506.
- 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.* 2005, 17, 215–222
- Takaichi, S., 2011. Carotenoids in Algae: Distributions, Biosyntheses and Functions. *Mar. Drugs* 9, 1101–1118.
- Templeton, D.W., Quinn, M., Van Wycken, S., Hyman, D., Laurens, L.M.L., 2012. Separation and quantification of microalgal carbohydrates. *Journal of Chromatography A*. 1270, 225–234.
- Terigar, B.G., Balasubramanian, S., Boldor, D., Xu, Z., Lima, M., Sabliov, C.M., 2010. Continuous microwave-assisted isoflavone extraction system: Design and performance evaluation. *Bioresour. Technol.* 101, 2466–2471.
- Thakur, R.K., Villette, C., Aubry, J.M., Delaplace, G., 2008. Dynamic emulsification and catastrophic phase inversion of lecithin-based emulsions. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 315, 285–293.
- Thompson Jr., G.A., 1996. Lipids and membrane function in green algae. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* 1302, 17–45.
- Toribio A. (2007). Développement de nouvelles approches méthodologiques en chromatographie de partage centrifuge en vue de la purification de molécules d'intérêt. Doctorat Pharmacognosie, Université de Reims Champagne-Ardenne, U.F.R. de Pharmacie, Reims
- Treweek, G.P., Morgan, J.J., 1977. The mechanism of *E. coli* aggregation by polyethyleneimine. *J. Colloid Interface Sci.* 60, 258–273.
- Trowell, H., 1976. Definition of dietary fiber and hypotheses that it is a protective factor in certain diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* 29, 417–427.
- Ursu, A.-V., Marcati, A., Sayd, T., Sante-Lhoutellier, V., Djelveh, G., Michaud, P., 2014. Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.* 157, 134–139.
- Vanthoor-Koopmans, M., Wijffels, R.H., Barbosa, M.J., Eppink, M.H.M., 2013. Biorefinery of microalgae for food and fuel. *Bioresour. Technol., Biorefineries* 135, 142–149.
- Villay, A., Laroche, C., Roriz, D., El alaoui, H., Delbac, F., Michaud, P., 2013. Optimisation of culture parameters for exopolysaccharides production by the microalga *Rhodella violacea*. *Biores. Technol.* 146: 732-735.
- Voet D., Voet J.G. 2005. Biochimie 2è édition. De Boeck (Eds). 1-1583.
- Wang, S.-B., Chen, F., Sommerfeld, M., Hu, Q., 2004. Proteomic analysis of molecular response to oxidative stress by the green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Planta* 220, 17–29.
- Wen, Z.-Y., Chen, F., 2003. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnol. Adv.* 21, 273–294.
- Widjaja, A., Chien, C.-C., Ju, Y.-H., 2009. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 40, 13–20.
- Xu, Z., Yan, X., Pei, L., Luo, Q., Xu, J., 2007. Changes in fatty acids and sterols during batch growth of *Pavlova viridis* in photobioreactor. *J. Appl. Phycol.* 20, 237–243.

- Yao, C., Ai, J., Cao, X., Xue, S., Zhang, W., 2012. Enhancing starch production of a marine green microalga *Tetraselmis subcordiformis* through nutrient limitation. *Bioresour. Technol.* 118, 438–444.
- Yasumatsu, K., Sawada, K., Moritaka, S., Misaki, M., Toda, J., Wada, T., Ishii, K., 1972. Whipping and Emulsifying Properties of Soybean Products. *Agric. Biol. Chem.* 36, 719–727.
- Yen, H.-W., Hu, I.-C., Chen, C.-Y., Ho, S.-H., Lee, D.-J., Chang, J.-S., 2013. Microalgae-based biorefinery – From biofuels to natural products. *Bioresour. Technol., Biorefineries* 135, 166–174.
- Young, G., Nippgen, F., Titterbrandt, S., Cooney, M.J., 2010. Lipid extraction from biomass using co-solvent mixtures of ionic liquids and polar covalent molecules. *Sep. Purif. Technol.* 72, 118–121.
- Yuan, J.-P., Gong, X.-D., Chen, F., 1997. Separation and Analysis of Carotenoids and Chlorophylls in *Haematococcus lacustris* by High-Performance Liquid Chromatography Photodiode Array Detection. *J. Agric. Food Chem.* 45, 1952–1956.
- Zayas, P.D.J.F., 1997. Emulsifying Properties of Proteins, in: *Functionality of Proteins in Food*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 134–227.
- Zhang, T., Chi, Z., Sheng, J., 2008. A Highly Thermosensitive and Permeable Mutant of the Marine Yeast *Cryptococcus aureus* G7a Potentially Useful for Single-Cell Protein Production and its Nutritive Components. *Mar. Biotechnol.* 11, 280–286.
- Zhekisheva, M., Boussiba, S., Khozin-Goldberg, I., Zarka, A., Cohen, Z., 2002. Accumulation of Oleic Acid in *Haematococcus Pluvialis* (chlorophyceae) Under Nitrogen Starvation or High Light Is Correlated with That of Astaxanthin Esters1. *J. Phycol.* 38, 325–331.
- Zheng, H., Yin, J., Gao, Z., Huang, H., Ji, X., Dou, C., 2011. Disruption of *Chlorella vulgaris* Cells for the Release of Biodiesel-Producing Lipids: A Comparison of Grinding, Ultrasonication, Bead Milling, Enzymatic Lysis, and Microwaves. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 164, 1215–1224.

Production scientifique

Articles dans des revues à comité de lecture :

BA, F., URSU, A.V., LAROCHE, C., DJELVEH, G. 2016. *Haematococcus pluvialis* soluble proteins: extraction, characterization, concentration/fractionation and emulsifying properties. *Bioresource technology*. 200 : 147-152.

Communications orales :

BA, F., FOISSARD, A., MARCHAL, L., DJELVEH, G., LAROCHE, C. 2016. Bioraffinerie d'*Haematococcus pluvialis*. CoFrRoCA 2016 - Clermont-Ferrand - 29 juin au 1er juillet 2016.

Communications par affiches :

BA, F., PERRIER, C., LAROCHE, C., DJELVEH, G. 2014. Bioraffinerie de microalgue : *Haematococcus pluvialis*. Extraction, caractérisation et séparation des principales molécules CoFrRoCA 2014 - Montpellier -15 au18 septembre 2014.

BA, F., PERRIER, C., DJELVEH, G., LAROCHE, C. 2014. Biorefinery of *Haematococcus pluvialis*. 6th IFIBIOP – ESBES International Conference - Lille, 7-10 septembre 2014.

BA F., LAROCHE C., URSU A.-V., MARCATI A., MICHAUD P., DJELVEH G. 2014. Extraction, solubilisation and functional properties of proteins from *H. pluvialis* 6th IFIBIOP – ESBES International Conference -Lille, 7-10 septembre 2014.

BA, F., LAROCHE, C., MICHAUD, P., DJELVEH, G. 2014. Bioraffinerie de microalgues. Journées de l'école doctorale SPI - Clermont-Ferrand.

Résumé

Le concept de *Raffinerie de microalgues* consiste à mettre au point des méthodes extrapolables à l'échelle industrielle permettant d'extraire, de séparer et de valoriser l'ensemble du contenu intracellulaire des microalgues. La mise en œuvre d'un tel concept nécessite d'avoir des données sur la composition, sur la possibilité de séparation, et sur les fonctionnalités des différentes fractions de la biomasse. Dans le cadre de ce travail, *Haematococcus pluvialis*, qui produit un pigment à forte valeur ajoutée (l'astaxanthine) mais pour laquelle peu d'information n'est disponible sur les autres composés de sa biomasse, a été choisie comme modèle de microalgue. L'objectif est de quantifier et d'étudier la possibilité de valorisation des différentes fractions de la biomasse à différents stades de culture.

Après une étape de lyse cellulaire par broyage haute pression, plusieurs fractions sont obtenues.

Les protéines présentes dans le surnageant de broyage ont fait l'objet d'une caractérisation en terme de répartition des masses molaires et plusieurs méthodes de purification / concentration ont été mises en œuvre. Les propriétés émulsifiantes (capacité émulsifiante, stabilité d'émulsion et index d'activité émulsifiante) ont été déterminées et comparées à celles d'un ingrédient commercial (caséinate de sodium). Cette étude a permis de montrer que les protéines d'*H. pluvialis* possèdent un fort potentiel en tant qu'agent émulsifiant.

Le surnageant de broyage, en plus des protéines, contient également des sucres, et une quantité importante de lipides et de pigments. Afin de séparer les composés hydrosolubles de ceux liposolubles dans le surnageant, une méthode basée sur l'utilisation du polyéthylèneimine (PEI) a été mise en œuvre. Ainsi il a été possible de définir des conditions permettant la floculation de 96 % des lipides et pigments en conservant 100 % des sucres et 89 % des protéines dans la phase aqueuse.

Dans la suite du travail, la chromatographie de partage centrifuge (CPC) a été testée afin de séparer les lipides et les pigments. L'utilisation d'un système heptane : méthanol (+ 2 % eau) a ainsi montré que cette méthode permet le fractionnement des composés liposolubles, principal verrou technologique de la bioraffinerie d'*H. pluvialis*. Un schéma intégré de bioraffinage d'*Haematococcus pluvialis* a ainsi pu être proposé.

Mots clés : Bioraffinerie, *Haematococcus pluvialis*, propriétés émulsifiantes, floculation au polyéthylèneimine, chromatographie de partage centrifuge

Abstract

The concept of *Refinery of microalgae* consists in finding experimental procedure allowing the separation / valorization of the intracellular components of microalgae with the aim of the scale-up at industrial level. However the implementation of such a concept requires the acquisition of data on the composition, component separation efficiencies, and their valorization ability. For this study, *Haematococcus pluvialis*, a known producer of a high value-added pigment (astaxanthin) was chosen as a model of microalgae. If the characteristic of the pigment of this microalga is indeed well defined, there is still a lack of knowledge on the other compounds of its biomass. The aim of this work is to quantify and to study the valorization potential of various fractions of the biomass at different stages of the culture.

After quantification and characterization of the various fractions of the biomass, cell lysis was achieved to obtain supernatant that contains beside pigment, proteins, sugars and important quantity of lipids.

Proteins in the supernatant were characterized in term of molecular masses distribution. Several methods based on combined effect of high pressure disruption / pH shifting and ultrafiltration were implemented for concentration/fractionation of protein matrix. The emulsifying properties (emulsifying capacity and stability) were determined and compared to those of a commercial ingredient (sodium caseinate). It has been shown that the proteins from *H. pluvialis* possess a high potential as emulsifying agent.

Using polyethyleneimine (PEI) an experimental procedure was tested to separate the hydrosoluble and liposoluble compounds from the supernatant. Thanks to this procedure, it was then possible to define experimental conditions permitting the flocculation of 96 % of lipids and pigments while 100 % of sugars and 89 % of proteins remained in the aqueous phase.

Afterward, the centrifugal partition chromatography (CPC) was tested to separate lipids and pigments. The use of a heptane : *méthanol* (+ 2 % water) system highlighted that this method induced the separation of the liposoluble compounds, the main technological deadlock in the biorefinery of *H. pluvialis*. Finally, an integrated flow-sheet for *Haematococcus pluvialis* biorefinery has been advised.

Keywords: Biorefinery, *Haematococcus pluvialis*, emulsifying properties, polyethyleneimine flocculation, centrifugal partition chromatography