



**HAL**  
open science

# Criblage, identification et caractérisations physico-chimiques d'exopolysaccharides de microalgues et Cyanobactéries

Clément Gagnard

► **To cite this version:**

Clément Gagnard. Criblage, identification et caractérisations physico-chimiques d'exopolysaccharides de microalgues et Cyanobactéries. Biochimie [q-bio.BM]. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2019. Français. NNT : 2019CLFAC067 . tel-03738066

**HAL Id: tel-03738066**

**<https://theses.hal.science/tel-03738066v1>**

Submitted on 25 Jul 2022

**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.

## Thèse

Présentée par Clément GAINARD

A l'Université Clermont-Auvergne pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR D'UNIVERSITE**

(Spécialités : Microbiologie et Biochimie des polymères)

Soutenue le 12 juillet 2019

---

### **Criblage, identification et caractérisations physico-chimiques d'exopolysaccharides de microalgues et Cyanobactéries**

---

Jury :

**Présidente du jury :** Pr Sylvia COLLIEC-JOUAULT, Responsable de recherche à l'Ifremer

**Examinatrice :** Dr Aurore DUBUFFET, MCF à l'Université Clermont-Auvergne

**Rapporteur :** Pr Thierry MAUGARD, Professeur à l'Université de La Rochelle

**Rapporteur :** Dr Olivier GONCALVES, MCF HDR à l'Université de Nantes

**Co-directeur de thèse :** Pr Philippe MICHAUD, Professeur à l'Université Clermont-Auvergne

**Co-directrice de thèse :** Dr Céline LAROCHE, MCF HDR à l'Université Clermont-Auvergne

Institut Pascal, UMR CNRS 6602, Axe Génie des Procédés, Energétiques et Biosystèmes

63178 AUBIERE, France



*Pour réussir,  
Travailler dur,  
Ne jamais abandonner et surtout chérir une obsession magnifique.*

*W. Disney*





## Remerciements

*Ce travail a été réalisé à l'Institut Pascal (UMR CNRS 6602), au sein de l'axe Génie des Procédés, Energétique et Biosystèmes (GePEB) de Clermont-Ferrand.*

*Au terme de ce travail, je tiens tout d'abord à remercier M. Philippe MICHAUD, Professeur à l'Université Clermont-Auvergne et le Mme Céline LAROCHE, MCF HDR à l'Université Clermont-Auvergne de m'avoir fourni un encadrement de qualité. Vous avez été disponibles, à l'écoute, m'avez apporté un soutien technique et prodiguer des conseils avisés qui m'ont permis d'avancer au cours de ces années et d'atteindre les objectifs visés. Je tiens également à les remercier pour la confiance dont ils ont fait preuve tout au long de ce travail.*

*Je remercie également M. Thierry MAUGARD, Professeur à l'Université de La Rochelle et M. Olivier GONCALVES, MCF HDR à l'Université de Nantes de l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail en acceptant d'en être les rapporteurs. Je remercie sincèrement Mme Sylvia COLLIEC-JOUAULT, Responsable de recherche à l'Ifremer et Mme Aurore DUBUFFET, MCF à l'Université Clermont-Auvergne d'avoir accepté avec bienveillance de juger ce travail. A nouveau je remercie l'ensemble des membres du jury pour leurs suggestions et remarques pertinentes lors de la soutenance qui ont permis d'élever encore un peu plus haut ce travail.*

*Je remercie sincèrement M. Guillaume PIERRE, MCF HDR à l'Université Clermont-Auvergne et M. Cédric DELATTRE, MCF HDR à l'Université Clermont-Auvergne pour m'avoir initié au monde de la glycochimie et transmis leurs connaissances, mais également pour tous ces moments de franche rigolade, dont un particulièrement savoureux dont je n'ai malheureusement aucun souvenir. A ce titre, je remercie M. Didier LE CERF, Professeur à l'Université de Rouen d'avoir pensé à prendre un feutre velleda effaçable !*

*Je n'oublie également pas M. Pascal DUBESSAY, MCF à l'Université Clermont-Auvergne, Mme Christine GARDARIN, Mme Nastassja PRYBYLSKI, Mme Alina-Violeta URSU ainsi que tous les membres du laboratoire (stagiaire, thésard, ingénieur) présents lors de ces travaux.*

*Enfin je tiens à exprimer ma sympathie envers tous les acteurs du projet POLYSALGUE pour leur bienveillance à mon égard lors des réunions d'équipes, et les remercier pour les échanges que nous avons eu qui ont permis d'enrichir mes connaissances scientifiques.*



# Table des matières

<b>Liste des abréviations</b> .....	15
<b>Liste des figures</b> .....	21
<b>Liste des tableaux</b> .....	29
<b>Introduction</b> .....	31
<b>Chapitre I : Etat de l'Art - Bibliographie</b> .....	35
1. Les microorganismes photosynthétiques : une ressource biologique inépuisable ! .....	35
1.1 Définition et origine.....	35
1.1.1 Les Cyanobactéries .....	36
1.1.2 Caractéristiques générales des microalgues .....	41
1.1.2.1 Une diversité de familles et d'espèces.....	41
1.1.2.1.1 Le royaume des Plantes.....	43
1.1.2.1.1.1 Le phylum des Chlorophyta.....	43
1.1.2.1.1.2 Le phylum des Rhodophyta .....	45
1.1.2.1.1.3 Le phylum des Charophyta.....	48
1.1.2.1.2 Le royaume des Chromista.....	48
1.1.2.1.2.1 Le phylum des Haptophyta .....	48
1.1.2.1.2.2 Le phylum des Ochrophyta.....	49
1.1.2.1.2.2.1 La classe des Bacillariophyceae .....	49
1.1.2.1.2.2.2 La classe des Chrysophyceae .....	49
1.1.2.1.2.2.3 La classe des Phaeophyceae .....	52

1.1.2.1.2.3	Le phylum des Miozoa .....	52
2.	Culture des microalgues.....	52
2.1	Effet des éléments constitutif du milieu de culture .....	52
2.1.1	Le Carbone .....	52
2.1.1.1	La Photosynthèse.....	53
2.1.1.1.1	Les chlorophylles .....	57
2.1.1.1.2	Les pigments surnuméraires.....	59
2.1.1.1.2.1	Les caroténoïdes .....	59
2.1.1.1.2.2	Les phycobilines .....	61
2.1.1.2	Le Carbone inorganique .....	62
2.1.1.3	Le Carbone organique .....	64
2.1.2	L'Azote.....	68
2.1.3	Le Phosphore.....	70
2.1.4	Le Soufre .....	71
2.1.5	Micronutriments et Vitamines.....	72
2.2	Effet des paramètres environnementaux.....	73
2.2.1	La lumière .....	73
2.2.2	La température.....	77
2.2.3	Le pH.....	78
2.2.4	Les conditions salines.....	79
2.2.5	Le cisaillement .....	79
2.3	Les modes de culture .....	80

2.3.1	Culture à ciel ouvert .....	80
2.3.2	Photobioréacteurs .....	82
3.	Molécules d'intérêts .....	86
3.1	Les lipides et acides gras polyinsaturés .....	86
3.2	Les protéines .....	87
3.3	Les pigments .....	88
3.4	Les polysaccharides .....	90
3.4.1	Généralités .....	90
3.4.2	Propriétés structurales et biochimiques .....	91
3.4.2.1	Les polysaccharides de réserve .....	93
3.4.2.1.1	L'amidon .....	94
3.4.2.1.2	Le glycogène .....	95
3.4.2.1.3	Le paramylon .....	96
3.4.2.1.4	La laminarine et la chrysolaminarine .....	96
3.4.2.2	Les polysaccharides pariétaux .....	98
3.4.2.2.1	PS pariétaux de Chlorophyta .....	98
3.4.2.2.2	PS pariétaux de Rhodophyta .....	100
3.4.2.2.3	PS pariétaux de Charophyta .....	101
3.4.2.2.4	PS pariétaux de Chromista .....	101
3.4.2.3	Les polysaccharides matriciels .....	104
3.4.2.3.1	Paramètres affectant la production d'exopolysaccharides .....	123
3.4.2.3.1.1	Eléments chimiques C, N, P, S .....	124

3.4.2.3.1.2	La salinité (NaCl) .....	127
3.4.2.3.1.3	L'irradiance.....	128
3.4.2.3.1.4	La température .....	128
3.4.2.3.2	Procédés d'extraction et de purification.....	129
3.4.2.3.3	Les voies de valorisations des exopolysaccharides.....	131
3.4.2.3.3.1	Les propriétés rhéologiques.....	131
3.4.2.3.3.2	Les activités biologiques.....	134
3.4.2.3.3.3	Marchés industriels et Brevets.....	137
3.4.2.3.3.3.1	Marché de la nutraceutique .....	137
3.4.2.3.3.3.2	Marché de la cosmétique.....	138
3.4.2.3.3.3.3	Marchés de la pharmaceutique et/ou de la thérapie .....	139
3.4.2.3.3.3.4	Autres .....	139
<b>Chapitre II : Matériels &amp; Méthodes.....</b>		<b>141</b>
1.	Matériel biologique : microalgues et Cyanobactéries.....	141
2.	Techniques de biologie moléculaire .....	146
2.1	Identification des souches.....	146
2.1.1	Extraction d'ADN .....	146
2.1.2	Amplification PCR et séquençage.....	146
3.	Construction d'un arbre phylogénétique.....	149
3.1	Analyses statistiques.....	149
3.2	Création de l'arbre phylogénétique .....	149
4.	Mise en œuvre des cultures.....	150

4.1	Milieux de culture.....	150
4.1.1	Milieux pour la culture des microalgues .....	150
4.1.2	Milieu pour la culture des Cyanobactéries .....	151
4.2	Conditions de cultures .....	153
4.2.1	Le criblage.....	153
4.2.2	Conditions de cultures pour l'obtention d'exopolysaccharides .....	153
4.2.2.1	Production d'exopolysaccharides en erlenmeyers.....	153
4.2.2.2	Production d'exopolysaccharides en photobioréacteurs et airlift.....	154
4.2.2.2.1	Cultures en photobioréacteur cylindrique .....	154
4.2.2.2.2	Cultures en photobioréacteur torique .....	155
4.2.2.2.3	Production en airlift.....	156
5.	Suivi des cultures .....	156
5.1	Quantification de la biomasse.....	156
5.2	Dosage des ions nitrates .....	157
5.3	Dosage des ions ammonium .....	157
5.4	Quantification des glucides extracellulaires .....	158
6.	Extraction et purification des exopolysaccharides.....	158
6.1	Polysaccharides issus des cultures en erlenmeyers .....	158
6.2	Polysaccharides issus des cultures en photobioréacteurs et airlift .....	158
7.	Analyse de la composition des EPS.....	159
7.1	Dosage des oses neutres .....	159
7.2	Dosage des oses acides .....	159



7.3	Correction des interférences .....	160
7.4	Dosage des oses totaux .....	161
7.5	Dosage des protéines .....	162
7.6	Dosage des sulfates.....	163
7.7	Analyse par spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IR-TF).....	163
8.	Caractérisation structurale des EPS .....	164
8.1	Composition en monosaccharides .....	164
8.1.1	Analyse par Chromatographie Echangeuse d'Anions Haute Performance couplée à un Détecteur Ampérométrique Pulsé (CEAHP-DAP).....	164
8.1.2	Analyse par Chromatographie Phase Gaz couplée à de la Spectrométrie de Masse (CPG/SM). .....	166
8.1.3	Détermination des liaisons glycosidiques .....	168
8.1.3.1	Préparation du réactif NaOH/DMSO .....	168
8.1.3.2	Méthylation des polysaccharides.....	169
8.1.3.3	Formation des acétates d'alditols partiellement méthylés (AAPM).....	169
9.	Caractérisations physico-chimiques des EPS .....	171
9.1	Déterminations des grandeurs macromoléculaires par Chromatographie d'Exclusion Stérique couplée à la Diffusion de la lumière Laser Multi-Angles (CES-DLMA).....	171
9.2	Etudes des propriétés rhéologiques .....	172
<b>Chapitre III : Résultats &amp; Discussions .....</b>		<b>173</b>
1.	Criblage.....	173
1.1	Identification des souches phénotype [EPS+] .....	173
1.2	Compositions en monosaccharides par CEAHP-DAP et CPG/SM-IE .....	198
2.	Cultures en photobioréacteurs.....	202

2.1	Production de biomasse et d'exopolysaccharides .....	202
3.	Caractérisation structurale des EPS .....	209
3.1	Caractérisations biochimiques .....	209
3.2	Analyses par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.....	213
3.3	Compositions en monosaccharides des EPS .....	215
3.4	Détermination des liaisons glycosidiques au sein de PSGN1 .....	226
4.	Identification des souches .....	230
4.1	Souche RCC4633 .....	230
4.2	Souches RCC3688 et RCC3707 .....	233
5.	Etude des propriétés physico-chimiques des EPS.....	240
5.1	Caractérisations physico-chimiques en régime dilué .....	240
5.2	Caractérisations rhéologiques en régime semi-dilué .....	243
5.2.1	Mesures en écoulements.....	243
5.2.2	Mesures en Oscillations .....	247
6.	Relation entre la composition en monosaccharides et l'appartenance phylogénétique des microalgues .....	250
	<b>Conclusion</b> .....	257
	<b>Références Bibliographiques</b> .....	261
	<b>Annexe 1</b> .....	319
	<b>Annexe 2</b> .....	320
	<b>Annexe 3</b> .....	321



## Liste des abréviations

<b>AA :</b>	Acide arachidonique
<b>AAPM :</b>	Acétate d'alditol partiellement <i>O</i> -méthylé
<b>AC :</b>	Anhydrase carbonique
<b>ADP :</b>	Adénosine diphosphate
<b>AGPI :</b>	Acide gras polyinsaturé
<b>ANR :</b>	Agence Nationale pour la Recherche
<b>AP :</b>	Allophycocyanine
<b>A.P.H.A :</b>	American Public Health Association
<b>Ara :</b>	Arabinose
<b>ARNr 18S :</b>	ARN ribosomique 18S
<b>ARNr 28S :</b>	ARN ribosomique 28S
<b>ASB :</b>	Albumine de sérum bovin
<b>ATP :</b>	Adénosine triphosphate
<b>BPS :</b>	Polysaccharide lié à la paroi
<b>BSTFA :</b>	<i>N,O</i> -bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide
<b>C* :</b>	Concentration critique de recouvrement
<b>CCAP :</b>	Culture Collection of Algae and Protozoa
<b>CEAHP :</b>	Chromatographie échangeuse d'anions haute performance
<b>CES :</b>	Chromatographie d'exclusion stérique
<b>Chl <i>a</i> :</b>	Chlorophylle <i>a</i>
<b>Chl <i>b</i> :</b>	Chlorophylle <i>b</i>
<b>Chl <i>c</i> :</b>	Chlorophylle <i>c</i>
<b>Chl <i>d</i> :</b>	Chlorophylle <i>d</i>

<b>Chl<i>f</i></b> :	Chlorophylle <i>f</i>
<b>CMI</b> :	Concentration minimale inhibitrice
<b>CPG</b> :	Chromatographie phase gaz
<b>CPS</b> :	Polysaccharide capsulaire
<b>DAP</b> :	Détecteur ampérométrique pulsé
<b>DFP</b> :	Densité de flux de photons
<b>Dha</b> :	Acide 3-deoxy- <i>lyxo</i> -2-heptulosarique
<b>DHA</b> :	Acide docosahexaénoïque
<b>DMSO</b> :	Diméthylsulfoxyde
<b>DLMA</b> :	Diffusion statique de la lumière laser multi-angles
<b>DP</b> :	Degré de polymérisation
<b>dRI</b> :	Indice de réfraction différentiel
<b>EPS</b> :	Exopolysaccharide
<b>EPA</b> :	Acide eicosapentaénoïque
<b>Fuc</b> :	Fucose
<b>G</b> :	Irradiance
<b>G'</b> :	Module élastique
<b>G''</b> :	Module visqueux
<b>G3P</b> :	Glycéraldéhyde-3-phosphate
<b>Gal</b> :	Galactose
<b>GalA</b> :	Acide galacturonique
<b>GalN</b> :	Galactosamine
<b>GalNAc</b> :	<i>N</i> -acétylgalactosamine
<b>Gc</b> :	Irradiance au point de compensation
<b>GePEA</b> :	Laboratoire Génie des Procédés, Environnement, Agro-alimentaire

<b>GLA :</b>	Acide $\gamma$ -linoléinique
<b>Glc :</b>	Glucose
<b>GlcA :</b>	Acide glucuronique
<b>GlcN :</b>	Glucosamine
<b>GlcNAc :</b>	<i>N</i> -acétylglucosamine
<b>Gs :</b>	Irradiance de saturation
<b>GulA :</b>	Acide guluronique
<b>HG :</b>	Homogalacturonane
<b>IE :</b>	Impact électronique
<b>Ip :</b>	Indice de polydispersité
<b>IP :</b>	Laboratoire Institut Pascal
<b>IR-TF :</b>	Infrarouge à transformée de Fourier
<b>Kdo :</b>	Acide 3-désoxy-D- <i>manno</i> -2-octoluonique
<b>LED :</b>	Diode électroluminescente
<b>LIENS :</b>	Laboratoire Littoral, ENvironnement et Sociétés
<b>LPS :</b>	Lipopolysaccharides
<b>Man :</b>	Mannose
<b>ManA :</b>	Acide mannuronique
<b>MCC :</b>	Mécanisme de concentration du CO <sub>2</sub>
<b>Mn :</b>	Masse molaire moyenne en nombre
<b>Mw :</b>	Masse molaire moyenne en masse
<b>NADPH, H<sup>+</sup> :</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
<b>NCBI :</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>PBS :</b>	Laboratoire Polymères, Biopolymères, Surfaces
<b>PBR :</b>	Photobioréacteur

<b>PC :</b>	Phycocyanine
<b>PE :</b>	Phycoérythrine
<b>PEt :</b>	Polyéthylène
<b>PGK :</b>	Phosphoglycérokinase
<b>PGP :</b>	Phosphoglycolate phosphatase
<b>PMMA :</b>	Polyméthacrylate de méthyle
<b>PPp :</b>	Polypropylène
<b>PR<sup>2</sup> :</b>	Protist Ribosomal Reference
<b>PS :</b>	Polysaccharide
<b>PSI (ou PS700) :</b>	Photosystème I
<b>PSII (ou PS680) :</b>	Photosystème II
<b>PSCN :</b>	EPS de <i>Chrysothila dentata</i> (CCAP904/1)
<b>PSDN :</b>	EPS de <i>Diacronema</i> (RCC3514)
<b>PSEN :</b>	EPS d' <i>Exanthemachrysis</i> (RCC1544)
<b>PSGN1 :</b>	EPS de <i>Glossomastix</i> (RCC3688)
<b>PSGN2 :</b>	EPS de <i>Glossomastix</i> (RCC3707)
<b>PSPN :</b>	EPS de <i>Pavlova</i> (RCC3438)
<b>PSSN :</b>	EPS de <i>Synechococcus</i> (RCC2380)
<b>PVC :</b>	Polychlorure de vinyle
<b>rbcl :</b>	Grande sous-unité « L » de la RuBisCo
<b>RCC :</b>	Roscoff Culture Collection
<b>RE :</b>	Réticulum endoplasmique
<b>Rg :</b>	Rayon de giration
<b>Rh :</b>	Rayon hydrodynamique
<b>Rha :</b>	Rhamnose

<b>Rib :</b>	Ribose
<b>RPA :</b>	Rayonnement photosynthétiquement actif
<b>RPS :</b>	Polysaccharide libéré
<b>RTA :</b>	Module de réflexion totale atténuée
<b>RuBisCO :</b>	Ribulose bis Phosphate Carboxylase Oxygénase
<b>RuBP :</b>	Ribulose-1,5-biphosphate
<b>SBR :</b>	Station Biologique de Roscoff
<b>SM :</b>	Spectrométrie de masse
<b>sPS :</b>	Polysaccharide sulfaté
<b>TAG :</b>	Triacylglycéride
<b>TMCS :</b>	Triméthylchlorosilane
<b>TFA :</b>	Acide trifluoroacétique
<b>UV :</b>	Ultra violet
<b>Xyl :</b>	Xylose
<b>3-PGA :</b>	3-phosphoglycérate
<b><math>\mu</math> :</b>	Taux de croissance spécifique
<b><math>\lambda_{\max}</math> :</b>	Longueur d'absorption optimale





## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Observations microscopiques de différentes morphologies de Cyanobactéries. Chroococcales : (a) <i>Chroococcus subnudus</i> , (b) <i>Chroococcus limneticus</i> , (c) <i>Cyanothece aeruginosa</i> , (d) <i>Snowella litoralis</i> , (e) <i>Microcystis aeruginosa</i> . Pleurocapsales : (f) <i>Pleurocapsa minor</i> . Oscillatoriales : (g) <i>Planktothrix agardhii</i> , (h) <i>Limnothrix redekei</i> , (i) <i>Arthrospira jenneri</i> , (j) <i>Johanseninema constrictum</i> , (k) <i>Phormidium</i> sp., (l) et (m) <i>Oscillatoria</i> sp., (n) <i>Schizothrix</i> sp., (o) <i>Tolypothrix</i> sp., (p) <i>Katagnymene accurata</i> ., Nostocales : (q) <i>Dolichospermum planctonicum</i> , (r) <i>Dolichospermum</i> sp., (s) <i>Nostoc</i> sp., (t) <i>Nodularia moravica</i> . Stigonematales : (u) <i>Stigonema</i> sp. 10 µm, (v) <i>Stigonema</i> sp. 20 µm (Dvořák <i>et al.</i> , 2015).....	37
<b>Figure 2</b> : Schémas des cellules de (a) Chlorophyta, (b) Rhodophyta et (c) Cyanobactérie (Pignolet <i>et al.</i> , 2013).....	38
<b>Figure 3</b> : Arbre phylogénétique des Cyanobactéries (Komarek <i>et al.</i> , 2014).....	40
<b>Figure 4</b> : Principaux événements endosymbiotiques au cours de l'évolution des plastes et de la phylogénie des principaux groupes de microalgues (Cooper & Smith, 2015).....	42
<b>Figure 5</b> : Arbre phylogénétique des Chlorophyta (Tragin <i>et al.</i> , 2016).....	44
<b>Figure 6</b> : Classification des Ochrophyta (Brown & Sorhannus, 2010).....	50
<b>Figure 7</b> : Schéma d'un chloroplaste.....	53
<b>Figure 8</b> : Réactions de la photosynthèse au sein du chloroplaste (phase lumineuse).....	55
<b>Figure 9</b> : Schéma du cycle de Calvin-Benson (phase obscure) (Boyer, 2009) (d'après Mazliak, 1974).....	57
<b>Figure 10</b> : Structures des (A) chlorophylles <i>a</i> , <i>b</i> et <i>d</i> et des (B) chlorophylles <i>c</i> .....	58
<b>Figure 11</b> : Spectre d'absorption des principaux pigments photosynthétiques.....	59
<b>Figure 12</b> : Structures moléculaires des principaux caroténoïdes (Guaratini <i>et al.</i> , 2009).....	60

**Figure 13** : Structures des groupements prosthétiques de (A) la phycocyanine, (B) la phycoérythrine et (C) la phycoérythrocyanine.....61

**Figure 14** : Schéma de la structure et du fonctionnement d'un phycobilisome. AP : allophycocyanine, PC : phycocyanine et PE : phycoérythrine.....62

**Figure 15** : Métabolisme hétérotrophe chez les microalgues. Les enzymes sont indiquées sous la forme d'une « nomenclature génétique ». Seules les voies métaboliques importantes pour la croissance hétérotrophe sont présentées (**Perez-Garcia et al., 2011**). .....67

**Figure 16** : Taux de croissance spécifique ( $\mu$ ) de *Chlamydomonas reinhardtii* en fonction de la densité de flux de photons (DFP). (●) (–) Ajustement du modèle Aiba,  $\mu = f(\text{DFP})$ . (●) (--) Intégration totale de la lumière pour un cycle jour/nuit avec une fraction de lumière ( $\epsilon$ ) de 0,66 :  $\mu = f(\text{DFP}) \times \epsilon$ . (●) ... Absence d'effets d'intégration de la lumière :  $\mu = \epsilon \times f(\text{DFP})$ . (■) Taux de croissance mesurés durant ce cycle (**Janssen et al., 2000**).....73

**Figure 17** : Processus de photosynthèse et de respiration chez les végétaux en fonction de l'intensité de lumière (**Tousignant & Delorme, 2006**).....75

**Figure 18** : Spectres d'irradiances des différentes sources de lumière (**Hultberg et al., 2014**). ..76

**Figure 19** : Cultures de (A) *Dunaliella salina*, (B) *Chlorella* sp. et (C) *Spirulina platensis*.....81

**Figure 20** : Production industrielle de *Porphyridium cruentum* dans un système raceway clos (AlgoSolis, GePEA, Université de Nantes, CNRS, France) (**Gaignard et al., 2019**).....83

**Figure 21** : Cultures de *Porphyridium cruentum* en (A) photobioréacteur vertical tubulaire (Copyright : Société Greensea, Mèze, France), (B) photobioréacteur plan non incliné en lumière artificielle (Copyright : Algosource Technology, France) et (C) photobioréacteur plan incliné en lumière naturelle (Copyright : Plateforme AlgoSolis, GePEA, Université de Nantes, CNRS) (**Gaignard et al., 2019**).....84

**Figure 22** : PBR annulaires (a) LED-PBR-100 avec un volume de culture de 90 L et (b) LED-PBR-10 avec un volume de culture de 8 L (**Sergejevová et al., 2015**). .....85

<b>Figure 23</b> : Principaux monosaccharides constitutifs des polysaccharides naturels ( <b>Kamerling &amp; Gerwig, 2007</b> ).....	93
<b>Figure 24</b> : Structures de (a) l'amylose et (b) de l'amylopectine. ....	94
<b>Figure 25</b> : Structure du paramylon.....	96
<b>Figure 26</b> : Structures de la laminarine et de la chrysolaminarine. ....	97
<b>Figure 27</b> : Structures des l'algaenanes isolés chez <i>Botryococcus braunii</i> (A) variété B, (B) variétés B et L et (C) variété L ( <b>Baudelet et al., 2017</b> ).....	99
<b>Figure 28</b> : Structure de la diatomée pennales <i>Pinnularia</i> ( <b>Armstrong &amp; Brasier, 2005</b> ).....	102
<b>Figure 29</b> : Structures hypothétiques des oligosaccharides caractérisés lors de l'analyse des PS de la paroi cellulaire de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> . (A) squelette de $\alpha$ -(1,3)-Manp et (B) fragments d'oligosaccharides. Bien que des liaisons $\alpha$ soient proposées ici, il n'existe aucune preuve établie du type de liaisons impliquées dans ces structures ( <b>Ford &amp; Percival, 1965</b> ).....	104
<b>Figure 30</b> : Classification des polysaccharides bactériens et microalgaux (adapté de <b>Prasanna, 2018</b> ).....	105
<b>Figure 31</b> : Régimes d'écoulement des fluides. $\tau$ : contrainte. $\gamma$ : taux de cisaillement. ....	132
<b>Figure 32</b> : Comportement d'une solution de polymère en fonction de la concentration.....	132
<b>Figure 33</b> : PBR cylindrique de 5 L. ....	154
<b>Figure 34</b> : PBR torique de 1,4 L. ....	155
<b>Figure 35</b> : Gradient d'élution pour l'analyse des monosaccharides en CEAHP-DAP. ....	165
<b>Figure 36</b> : Mécanisme de triméthysilylation des <i>O</i> -glycosides (adapté de <b>Kamerling et al., 1975</b> ).....	167
<b>Figure 37</b> : Méthode de préparation des AAPM (adaptée de <b>Garon-Lardière, 2004</b> ). ....	168

<b>Figure 38</b> : Mesures des absorbances à $\lambda=750$ nm (●), des ions nitrates (●) et des glucides extracellulaires (●) effectuées lors du criblage sur les cultures en milieu f/2 des souches [EPS <sup>+</sup> ] (cycle jour/nuit de 16 h/8 h et une irradiance de 300 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). .....	184
<b>Figure 39</b> : Proportion des souches de phénotype [AbsC], [EPS <sup>-</sup> ] et [EPS <sup>+</sup> ] au sein des différents phyla. ....	197
<b>Figure 40</b> : Croissance cellulaire (●), concentration en $\text{NO}_3^-$ (●) et concentration en glucides extracellulaires (●) mesurées lors de la culture de <i>Glossomastix</i> sp. (RCC3688) en PBR 5 L. ..	206
<b>Figure 41</b> : Croissance cellulaire (●), concentration en $\text{NO}_3^-$ (●) et concentration en glucides extracellulaires (●) mesurées lors de la culture de <i>Chrysothila dentata</i> (CCAP904/1) en PBR 1,4 L. ....	207
<b>Figure 42</b> : Croissance cellulaire (●), concentration en $\text{NO}_3^-$ (●) et concentration en glucides extracellulaires (●) mesurées lors de la culture de <i>Pavlova</i> (RCC3438) en PBR 1,4 L. ....	207
<b>Figure 43</b> : Croissance cellulaire (●), concentration en $\text{NO}_3^-$ (●) et concentration en glucides extracellulaires (●) mesurées lors de la culture de <i>Diacronema</i> (RCC3514) en PBR 1,4 L. ....	208
<b>Figure 44</b> : Croissance cellulaire (●), concentration en $\text{NO}_3^-$ (●) et concentration en glucides extracellulaires (●) mesurées lors de la culture d' <i>Exanthemachrysis</i> (RCC1544) en PBR 5 L...	208
<b>Figure 45</b> : Aspects des (A) PSGN1, (B) PSCN, (C) PSPN, (D) PSDN, (E) PSEN, (F) PSGN2 et (G) PSSN après purification. ....	209
<b>Figure 46</b> : Spectres IR-TF de PSGN1 ( <i>Glossomastix</i> RCC3688) (●), PSEN ( <i>Exanthemachrysis</i> ) (●) et PSCN ( <i>Chrysothila dentata</i> ) (●). ....	214
<b>Figure 47</b> : Spectres IR-TF de PSPN ( <i>Pavlova</i> ) (●), PSDN ( <i>Diacronema</i> ) (●) et PSGN2 ( <i>Glossomastix</i> RCC3707) (●).....	214
<b>Figure 48</b> : Spectres IR-TF de PSSN ( <i>Synechococcus</i> ) (●).....	215

<b>Figure 49</b> : Chromatogramme obtenu pour PSGN1 après analyse par CPG/SM-IE (70 eV). Ara : arabinose, Xyl : xylose, Rha : rhamnose, Gal : galactose, Glc : glucose, GlcA : acide glucuronique.....	216
<b>Figure 50</b> : Voies de fragmentation des dérivés glycosides- <i>O</i> -triméthylsilyles par CPG/SM-IE (70 eV) ( <b>Benaoun, 2017</b> ).....	217
<b>Figure 51</b> : Activités enzymatiques de la glucuronane lyase (0,166 U/μL) testée sur (A) un glucuronane bactérien (2 g.L <sup>-1</sup> ) + 2 μL d'enzyme, et (B) l'EPS extrait d'une culture en erlenmeyer de <i>Exanthemachrysis</i> (RCC1544) (2 g.L <sup>-1</sup> ), (●) : EPS + 2 μL d'enzyme, (●) : EPS + 4 μL d'enzyme, (●) : EPS seul, (●) : EPS + 4 μL d'enzyme dénaturée. ....	221
<b>Figure 52, partie 1</b> : Chromatogramme des ions totaux des AAPM du PSGN1 obtenus après hydrolyse puis triméthysilylation et mesurés par CPG/SM-IE. ....	227
<b>Figure 52, partie 2</b> : Spectres de masse des principaux fragments en impact électronique obtenus lors de l'analyse par CPG/SM-IE du PSGN1 après hydrolyse et triméthysilylation. ....	228
<b>Figure 53</b> : Migration sur gel d'agarose des produits PCR obtenus à partir des couples d'amorces Hap454, Prym454 et LSU1 sur de l'ADN total issu de la souche RCC4633. Les couples d'amorces spécifiques du gène de l'ARNr 18S ont été sélectionnés à partir de <b>Edge et al. (2013)</b> et celui spécifique du gène de l'ARNr 28S à partir de <b>Bittner et al. (2013)</b> .....	230
<b>Figure 54</b> : Séquences d'ADN des produits PCR obtenus avec les couples d'amorces Hap454, Prym454 et LSU1.....	231
<b>Figure 55</b> : Alignements multiples de séquences de Pinguiphyceae ayant permis le design du couple d'amorces 610F+1030R (Ping18S''). <b>Rouge</b> : les nucléotides sont identiques entre les séquences, <b>Bleu</b> : correspond à une différence de nucléotide entre les séquences, <b>Noir</b> : les nucléotides ne correspondant pas aux nucléotides de la séquence consensus. ....	234
<b>Figure 56</b> : Migration sur gel d'agarose des produits PCR obtenus à partir des couples d'amorces Ping18S', Ping18S'', Ping28S et PingrbcL et des ADN totaux des souches RCC3688 et RCC3707.....	235

<b>Figure 57</b> : Séquences d'ADN des produits PCR de la souche RCC3707 obtenus avec les couples d'amorces Ping18S', Ping18S'' et PingrbcL. ....	236
<b>Figure 58</b> : Séquences d'ADN des produits PCR de la souche RCC3688 obtenus avec les couples d'amorces Ping18S'', Ping28S et PingrbcL.....	237
<b>Figure 59</b> : Alignements des séquences d'ADN des produits de PCR des souches RCC3688 et RCC3707 obtenus avec les couples d'amorces (A) Ping18S'' et (B) PingrbcL. Rouge : les nucléotides sont identiques entre les séquences, Bleu : correspond à une différence de nucléotide entre les séquences, Noir : les nucléotides ne correspondent pas aux nucléotides de la séquence consensus.....	239
<b>Figure 60</b> : Chromatogramme des distributions des masses molaires en fonction du volume d'éluion de (A) PSCN, (B) PSPN, (C) PSDN, (D) PSSN, (E) PSGN1 et (F) PSGN2. (● et ●) : signal dRI, (et --) : signal de diffusion de la lumière (LS), (● et ...) : zone d'intégration pour la détermination des valeurs de Mn, Mw, Ip, Rg et Rh. ....	242
<b>Figure 61</b> : Evolution de la viscosité apparente (Pa.s) de solutions aqueuses additionnées de 200 ppm de NaN <sub>3</sub> de (A) PSGN1 et (B) PSGN2 en fonction du gradient de cisaillement (s <sup>-1</sup> ) à 0,5, 1, 5, 10 et 20 g.L <sup>-1</sup> et à 25 °C. ....	244
<b>Figure 62</b> : Variation de la viscosité apparente (Pa.s) de solutions aqueuses de (●) PSGN1, (●) PSGN2, (●) PSPN et (●) alginate à 20 g.L <sup>-1</sup> additionnées de 200 ppm de NaN <sub>3</sub> en fonction du gradient de cisaillement (s <sup>-1</sup> ) à 25 °C. ....	245
<b>Figure 63</b> : PSGN2 solubilisé à 1, 5, 10 et 20 g.L <sup>-1</sup> avec addition de 200 ppm de NaN <sub>3</sub> dans (A) l'eau et (B) NaCl 0,15 M.....	246
<b>Figure 64</b> : Evolution de la contrainte (Pa) à 25 °C sur des solutions aqueuses de (●) PSGN1, (●) PSGN2, (●) PSPN et (●) alginate à 20 g.L <sup>-1</sup> en fonction du gradient de cisaillement (s <sup>-1</sup> ). ....	247
<b>Figure 65</b> : Représentation des modules élastique G' et visqueux G'' (Pa) en fonction de la fréquence (Hz) des solutions aqueuses de (A) PSGN1 et (B) PSGN2 à 0,5, 1, 5, 10 et 20 g.L <sup>-1</sup> additionnées de 200 ppm de NaN <sub>3</sub> . Symboles pleins : G'. Symboles vides : G''.....	248

**Figure 66** : Représentation des modules élastique  $G'$  et visqueux  $G''$  (Pa) en fonction de la fréquence (Hz) de solutions aqueuses de (●) PSGN1, (●) PSGN2, (●) PSPN et (●) Alginate à 20 g.L<sup>-1</sup> additionnées de 200 ppm de NaN<sub>3</sub>. Symboles pleins :  $G'$ . Symboles vides :  $G''$ .....249

**Figure 67** : Evolution des modules élastique  $G'$  et visqueux  $G''$  (Pa) en fonction de la contrainte (Pa) sur des solutions aqueuses (●) PSGN1, (●) PSGN2, (●) PSPN et (●) Alginate à 20 g.L<sup>-1</sup> et à 25 °C. Symboles pleins :  $G'$ . Symboles vides :  $G''$ .....250

**Figure 68** : Compositions en oses neutres (Rha, Gal, Ara, Glu, Man, Fuc, Xyl, Rib) et en acides uroniques (UA) (exprimées en % de la composition totale) de 81 souches de microalgues (genres et/ou espèces). Les espèces ont été placées sur l'arbre phylogénétique réalisé à partir de 210 séquences d'ADN codant pour l'ARNr 18S, appartenant à 15 classes différentes et 7 phyla distincts (méthode du Neighbor-Joining, 1260 itérations). Les positions des souches écrites en gras ont été déterminées à partir des séquences correspondant à l'espèce donnée. Pour les autres souches, des séquences appartenant à une espèce du même genre ont été utilisées. ■ : 1<sup>er</sup> monosaccharide majoritaire, ■ : 2<sup>ème</sup> monosaccharide majoritaire, ■ : monosaccharide secondaire, ★ : proportions d'acides uroniques obtenues par dosage colorimétrique, ► : présence de Rib.....  
.....254

**Figure 69** : Analyses des variations en monosaccharides au sein des EPS produits par les microalgues des phyla Charophyta (■), Chlorophyta (■), Rhodophyta (■), Ochrophyta (■) and Haptophyta (■) (16, 23, 13, 20 et 9 compositions en monosaccharides, respectivement, incluant les données de la bibliographie et les résultats de cette étude). Le phylum des Miozoa n'a pas été inclus dans cette analyse car seulement deux compositions sont disponibles dans la littérature. Les lettres différentes indiquent des différences statistiques significatives entre les phyla. ○ et ★ : valeurs aberrantes non prises en compte. NS: Résultats non significatifs. ....256





## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Classification des Rhodophyta (d'après <i>Yoon et al., 2017</i> ). .....	46
<b>Tableau 2</b> : Longueurs d'ondes absorbées par les différentes chlorophylles. ....	58
<b>Tableau 3</b> : Caractérisations structurales des EPS de microalgues et de Cyanobactéries. ....	106
<b>Tableau 4</b> : Structures d'oligosaccharides provenant d'EPS de microalgues et Cyanobactéries. .... .....	119
<b>Tableau 5</b> : Activités biologiques des EPS de microalgues et de Cyanobactéries. ....	134
<b>Tableau 6</b> : Liste des souches de la RCC criblées. ....	141
<b>Tableau 7</b> : Couples d'amorces utilisés pour l'amplification PCR et l'identification de la souche RCC4633. ....	148
<b>Tableau 8</b> : Couples d'amorces utilisés pour les amplifications PCR et les identifications des souches RCC3688 et RCC3707. ....	148
<b>Tableau 9</b> : Solutions pour l'élaboration des milieux de culture milieu f/2. ....	151
<b>Tableau 10</b> : Solutions pour l'élaboration du milieu PCR-S11-Red Sea. ....	152
<b>Tableau 11</b> : Solutions pour la réalisation du dosage de Lowry. ....	162
<b>Tableau 12</b> : Composition des gradients pour l'analyse des polysaccharides en CEAHP-DAP. .... .....	165
<b>Tableau 13</b> : Criblage de 166 souches de la RCC pour la détection de phénotype [EPS+]. ....	174
<b>Tableau 14</b> : Compositions en monosaccharides obtenues par CPG/SM-IE et CEAHP-DAP des EPS des souches phénotype [EPS+]. ....	200
<b>Tableau 15</b> : Concentrations initiales ( $T_0$ ) et finales ( $T_f$ ) du nombre de cellules.mL <sup>-1</sup> , des ions NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> et glucides extracellulaires des souches cultivées en PBR 5 L et 1,4 L, ainsi que les quantités d'EPS obtenues après extraction et purification. ....	204

<b>Tableau 16</b> : Compositions globales des EPS obtenus après cultures en PBR, Airlift ou Erlenmeyers. Les résultats sont exprimés en % massique d'échantillon. La conductivité (exprimée en $\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) et a été déterminée sur des solutions d'EPS de $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . .....	210
<b>Tableau 17</b> : Compositions en monosaccharides des EPS traités par hydrolyse au TFA 2M et analysés par CEAHP-DAP et CPG/SM-IE (exprimées en ratio molaire).....	218
<b>Tableau 18</b> : Activités biologiques des sPS extraits de <i>Porphyridium</i> . .....	223
<b>Tableau 19</b> : Comparaison des conditions de culture pour la production d'EPS des souches <i>Glossomastix</i> (RCC3688) et (RCC3707). .....	224
<b>Tableau 20</b> : Profil des Acétates d'Alditol Partiellement <i>O</i> -Méthylés (AAPM) et détermination des liaisons glycosidiques du PSGN1, obtenus en CPG/SM-IE après méthylation et acétylation. ... ..	229
<b>Tableau 21</b> : Pourcentages de similarités et de couverture des séquences des produits PCR des couples d'amorces Hap454, Pym454 et LSU1. ....	232
<b>Tableau 22</b> : Pourcentages de similarités et de couverture des séquences des produits PCR des couples d'amorces Ping18S', Ping18S'', Ping28S et PingrbcL.....	238
<b>Tableau 23</b> : Caractéristiques physico-chimiques des EPS déterminées à partir des analyses en CES-DLMA-dRI. ....	241

## Introduction

Les algues sont des organismes eucaryotes se développant, le plus souvent, dans des milieux aquatiques et capables de réaliser la photosynthèse oxygénique assimilable à une réduction du CO<sub>2</sub> et à une oxydation de l'eau *via* l'utilisation de l'énergie lumineuse. Ces organismes ne partagent pas d'ancêtre commun unique et constituent donc un groupe polyphylétique. Deux types d'algues aux caractéristiques très différentes sont à considérer : les macroalgues qui sont des macroorganismes pluricellulaires avec des organes bien différenciés, et les microalgues qui sont des microorganismes unicellulaires. Les Cyanobactéries ou « microalgues bleues » qui appartiennent au groupe des procaryotes sont parfois assimilées ou confondues avec les microalgues dans le langage commun. Elles forment cependant un groupe phylogénétique bien à part. Les microalgues et les Cyanobactéries représentent une part importante de la biomasse végétale sur Terre. Elles sont extrêmement diversifiées, regroupant selon les auteurs entre 200 000 et 800 000 espèces (**Ebenezer *et al.*, 2012**), dont seulement 35 000 ont été complètement identifiées à ce jour (**Cheng & Ogden, 2011**). Elles peuvent être divisées en plusieurs groupes, tels que les Cyanobactéries, les Chlorophyta, les Rhodophyta, les Ochrophyta, les Haptophyta, les euglènes et les glaucophytes. Même si elles ont colonisé majoritairement les milieux aquatiques (eaux douces, saumâtres et milieux marins), elles sont également capables de se développer dans des environnements variés tels que des lacs acides, des eaux hypersalines et des déserts.

Ces microorganismes qui sont à l'origine d'une grosse partie de la biomasse terrestre et souvent à la base de la chaîne alimentaire suscitent un intérêt croissant dans divers domaines applicatifs depuis quelques dizaines d'années. En effet, dans un contexte d'augmentation de la teneur de l'atmosphère en CO<sub>2</sub> et de la raréfaction de terres arables qui doivent, et devront, être utilisées prioritairement pour produire des denrées alimentaires, les microalgues peuvent présenter des solutions alternatives pour limiter les émissions de CO<sub>2</sub> et fournir de nombreux composés d'intérêt tels que des biocarburants de 3<sup>ème</sup> génération ou des composés à haute valeur ajoutée. En effet, les microalgues et Cyanobactéries ne nécessitent théoriquement que de l'eau, du CO<sub>2</sub> et de la lumière pour se développer même si l'intensification de leurs procédés de culture reste encore un challenge industriel pour une exploitation durable et viable d'un point de vue

économique. Les récents progrès en matière de culture et de bioraffinage de microalgues, principalement issus de la volonté de développer une filière de production de vecteurs énergétiques à partir de ces microorganismes, rend désormais possible l'exploitation industrielle de certains d'entre eux, tout du moins pour la production de composés à hautes ou très hautes valeurs ajoutées. En effet, si on fait abstraction de la culture de phytoplancton pour l'alimentation des alevins de poissons en pisciculture, à peine une dizaine d'espèces de microalgues et Cyanobactéries sont actuellement réellement exploitées. Cependant la diversité phylogénique des microalgues, corrélée à une grande diversité métabolique les rend très attractives pour l'identification et l'exploitation de nouvelles classes de composés tels que les polysaccharides.

Les polysaccharides (PS) sont des molécules de hauts poids moléculaires constitués de monosaccharides (principalement des hexoses et des pentoses) liés par des liaisons glycosidiques. Cette famille de polymères aux structures très complexes et pas toujours totalement élucidées a fait l'objet de nombreux travaux de recherche chez les animaux, champignons, bactéries et plantes supérieures (incluant les macroalgues). Un certain nombre d'entre eux sont désormais largement installés dans le domaine industriel pour leurs propriétés texturantes et/ou comme actifs biologiques. A titre d'exemples on peut citer les alginates, carraghénanes, pectines et guar exploités pour leurs propriétés épaississantes, stabilisantes ou gélifiantes, ou encore les héparines exploitées comme anticoagulants. Par opposition, les PS et plus particulièrement les exopolysaccharides (EPS) relargués dans l'environnement par les microalgues et les Cyanobactéries ne font l'objet d'investigations que depuis très peu de temps (**Rossi & De Philippis, 2016 ; Delattre *et al.*, 2016**) et le nombre de nouvelles espèces identifiées comme productrices d'EPS n'augmente que depuis peu. Elles appartiennent principalement aux familles des Desmidiaceae, Chlamydomonadaceae, Chlorellaceae, Porphyridiaceae et Glaucosphaeraceae chez les microalgues, et Oscillatoriaceae, Microcoleaceae et Nostocaceae chez les Cyanobactéries. Cette augmentation du nombre d'EPS de microalgues décrits est corrélée avec la description croissante de leurs activités biologiques *in vitro* et *in vivo* (antiparasitaire, immunomodulatrice, antibactérien, anticancéreux, anti-inflammatoire, antioxydant et anticoagulant) et de leurs propriétés rhéologiques. Malgré cela, les EPS issus des microorganismes photosynthétiques restent encore trop peu étudiés et faiblement documentés au regard de leur diversité en termes d'origine taxonomique.

Ce constat peut assez facilement s'expliquer par la complexité des structures de ces polysaccharides souvent composés de plusieurs oses différents (jusqu'à 7 chez certains EPS de Cyanobactéries) liés sans unités de répétition apparentes et par plusieurs types de liaisons glycosidiques. Leur substitution par de nombreux groupements non sucre tels que des sulfates ou les acides organiques vient encore renforcer cette hétérogénéité et complexité structurale. Par ailleurs, les modes de productions de ces métabolites sur des temps de culture longs et avec des conditions de culture spécifiques ne permettent pas toujours d'identifier les souches productrices. Dans ce contexte les microalgues et Cyanobactéries conservent donc un intérêt de tout premier ordre pour l'identification de nouvelles structures polysaccharidiques porteuses de propriétés innovantes.

C'est sur cette observation qu'est né le projet POLYSALGUE (criblage, identification et mise en œuvre de POLYSaccharides de microALGUEs comme actifs biologiques et hydrocolloïdes). Porté par l'Institut Pascal (IP), en partenariat avec d'autres laboratoires académiques tels que les laboratoires Polymères, Biopolymères, Surfaces (PBS), Littoral, ENvironnement et Sociétés (LIENS), Génie des Procédés, Environnement, Agro-alimentaire (GePEA) et la société AlgoSource Technologies, ce projet a été labellisé par les pôles de compétitivité Mer Bretagne et Valorial. Financé par l'Agence Nationale pour la Recherche (ANR), il vise à améliorer le niveau de connaissances sur les EPS en lien avec la diversité des microalgues/Cyanobactéries productrices d'EPS, en vue de leur exploitation dans divers domaines industriels. Ce projet vise donc à : i) explorer le potentiel des microorganismes photosynthétiques à produire des EPS, ii) identifier et caractériser de nouveaux EPS possédant des activités biologiques et rhéologiques originales, iii) relier la diversité des compositions en monosaccharides et l'appartenance phylogénétique des microalgues/Cyanobactéries et iv) valoriser les résultats *via* la mise sur le marché d'une ou plusieurs de ces biomolécules à destination des secteurs agroalimentaires, cosmétiques et/ou pharmaceutiques.

C'est dans ce contexte que s'intègre l'étude présentée dans ce manuscrit qui visait d'une part à identifier de nouveaux genres producteurs d'EPS à l'aide d'un criblage réalisé sur 166 souches (150 microalgues et 16 Cyanobactéries) de la station biologique de Roscoff, et d'autre part à étudier leurs compositions et structures après les avoir produits en photobioréacteurs afin de tenter de corrélérer la diversité structurale avec l'appartenance phylogénétique.

Ce manuscrit s'articule autour de 3 chapitres :

Tout d'abord, le chapitre (I) présente l'état de l'art concernant les microalgues et Cyanobactéries, en y incluant leurs classifications, les paramètres influençant leur développement, les différents modes de cultures, et enfin les principaux produits dérivés de leur exploitation. Les PS, et plus spécifiquement les EPS feront l'objet d'un développement plus poussé.

Le chapitre (II) décrira les matériels et les méthodologies expérimentales employés. Seront précisés dans cette partie les différents milieux et procédés de culture, la méthode d'extraction et de purification des EPS ainsi que les protocoles ayant permis l'analyse des compositions globales et structurales de ces derniers.

Le chapitre (III) exposera l'ensemble des résultats obtenus, à savoir ceux du criblage des 166 microalgues et Cyanobactéries, ainsi que les compositions en monosaccharides des EPS nouvellement isolés. Ces résultats feront l'objet d'une discussion approfondie et seront comparés à ceux de la littérature dans le but de mettre en évidence les apports scientifiques de ce projet par rapport aux connaissances actuelles. Le lien entre la composition en monosaccharides et l'appartenance phylogénétique des microalgues et Cyanobactéries productrices d'EPS sera également discuté.

Enfin, une conclusion reprendra les informations essentielles et des perspectives y seront dégagées.

# Chapitre I : Etat de l'Art - Bibliographie

## 1. Les microorganismes photosynthétiques : une ressource biologique inépuisable !

Le premier chapitre de ce manuscrit présente une introduction générale aux microorganismes photosynthétiques au travers d'une étude bibliographique. Il traite de la classification des microalgues et Cyanobactéries, des différents modes de cultures permettant leur production et des principaux composés issus de leur exploitation. Une attention toute particulière sera portée aux polysaccharides, et plus précisément aux exopolysaccharides (EPS), qui sont l'objet de ce projet de recherche. L'objectif est d'établir un bilan bibliographique des connaissances sur la production d'EPS par les microalgues et Cyanobactéries, et présenter leurs structures et propriétés techno-fonctionnelles.

### 1.1 Définition et origine

Les microalgues sont des microorganismes photosynthétiques eucaryotes, c'est-à-dire qu'elles possèdent un noyau, contrairement aux Cyanobactéries qui sont des microorganismes procaryotes (sans noyau). Le préfixe « micro » est employé en raison de leur taille qui varie de quelques micromètres à une centaine de micromètres. Si dans la littérature le terme microalgue est parfois utilisé pour désigner à la fois les microalgues eucaryotes et les Cyanobactéries, la distinction entre ces deux types de microorganismes sera réalisée systématiquement dans ce manuscrit afin d'éviter toute confusion. La grande majorité de ces microorganismes peuplent les océans, mers, lacs et rivières. L'existence des Cyanobactéries remonte à plus de 3,5 milliard d'années (Schopf, 2000). L'atmosphère primitive de la Terre était alors riche en méthane ( $\text{CH}_4$ ) et en dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ). Les Cyanobactéries ont modifié cette atmosphère pour la rendre telle qu'elle existe aujourd'hui *via* le processus de photosynthèse. En effet, les Cyanobactéries sont capables d'oxyder l'eau ( $\text{H}_2\text{O}$ ) en dioxygène ( $\text{O}_2$ ) afin d'extraire du pouvoir réducteur de leur environnement et réduire du  $\text{CO}_2$  en matière organique complexe. Au cours de l'évolution, ce processus bioénergétique a été transmis aux microalgues au travers d'endosymbioses (absorption d'une cellule par une autre) successives et l'atmosphère primitive s'est enrichie progressivement en  $\text{O}_2$  ce qui a permis la formation d'une couche d'ozone ou ozonosphère dans la stratosphère par action du rayonnement solaire sur l' $\text{O}_2$ . Cette couche d'ozone absorba et absorbe toujours une



partie importante (jusqu'à 50 %) du rayonnement UV accélérant ainsi l'apparition de nouvelles formes de vie, notamment terrestres. L'ensemble des microorganismes photosynthétique seraient aujourd'hui responsables de la production de plus de la moitié de l'O<sub>2</sub> atmosphérique. L'autre moitié proviendrait des plantes terrestres.

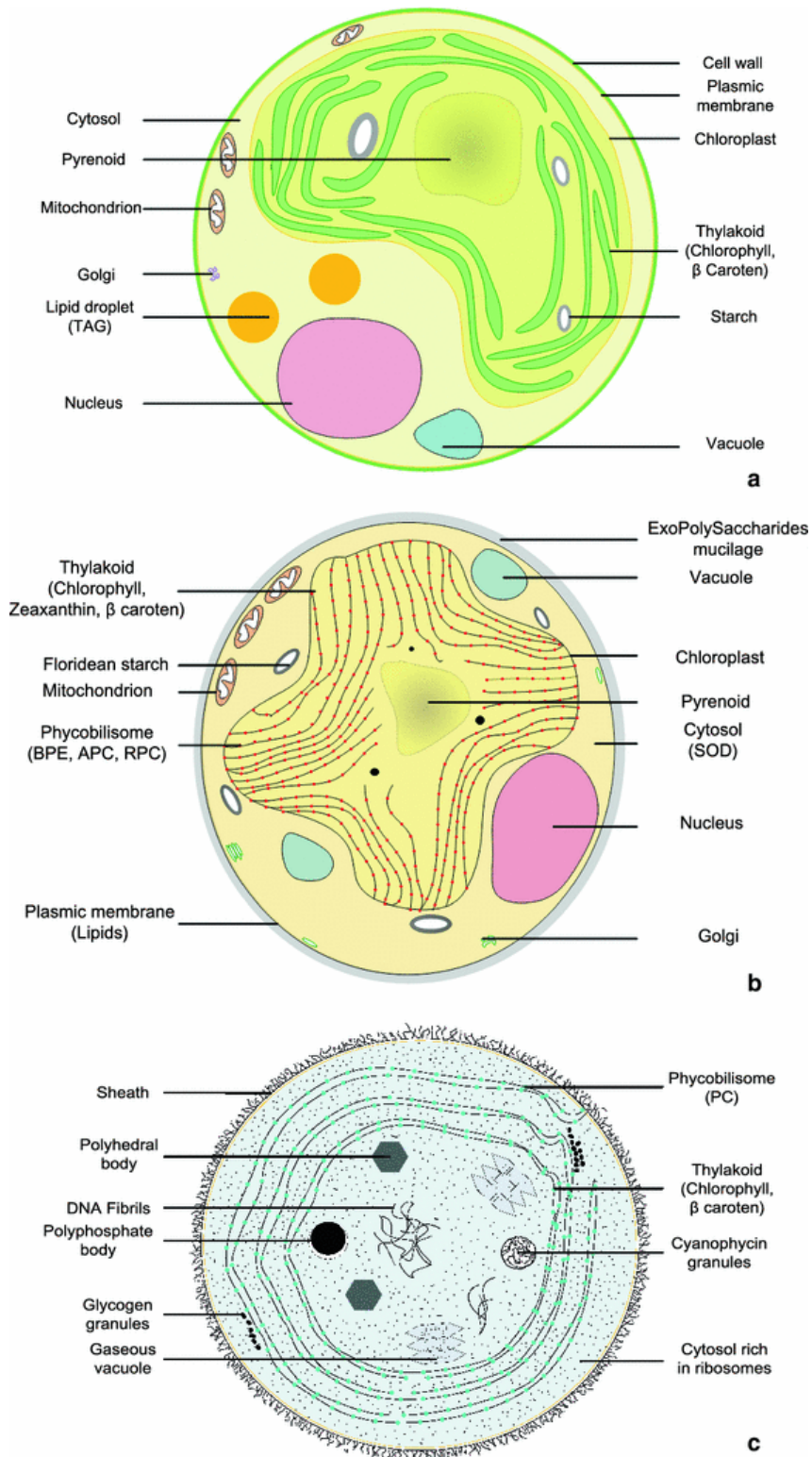
### 1.1.1 Les Cyanobactéries

Les Cyanobactéries sont des microorganismes unicellulaires procaryotes (eubactéries) possédant la capacité de photosynthèse oxygénique. On les appelle souvent « microalgues bleues » en raison de leur teneur en phycocyanine, un pigment protéique qui leur donne une couleur bleu-verte caractéristique. Ces organismes sont exclusivement unicellulaires et possèdent des morphologies très variées (**Figure 1**). Ces bactéries peuvent également s'associer les unes aux autres au sein d'une matrice mucilagineuse. On parle alors de « colonies ». Au sein d'une colonie, les cellules peuvent être espacées les unes des autres de manière anarchique ou au contraire être agencées de manière précise. Dans le premier cas, les colonies sont qualifiées de non filamenteuses. Elles forment une masse amorphe de cellules regroupées au sein d'une même matrice mucilagineuse (gaine mucilagineuse). Ce mucilage est essentiellement composé de polysaccharides (PS) (**De Philippis & Vincenzini, 1998**). Dans le second cas, les Cyanobactéries sont qualifiées de filamenteuses. Certains ouvrages parlent même de pluricellularité (**Schirrmeister *et al.*, 2013**). Les cellules sont alignées les unes à la suite des autres sous forme de filaments (trichomes), généralement regroupés au sein d'une gaine mucilagineuse. Les trichomes peuvent former des connexions entre eux. Tous les organismes appartenant à ce groupe sont pourvus de deux photosystèmes (PSI et PSII), de chlorophylle *a* (Chl *a*) (mais pas de chlorophylle *b* (Chl *b*)), ainsi que de caroténoïdes. Enfin ces organismes sont riches en pigments protéiques accessoires rouges et bleus tels que les phycobiliprotéines (phycocyanine, allophycocyanine et phycoérythrine). Ces dernières sont constituées d'un chromophore qualifié de phycobiline qui leur donne leur spécificité d'absorption et d'une partie protéique. Ces phycobiliprotéines s'associent pour former un macrocomplexe protéique qualifié de phycobilisome qui assure la fonction d'antenne collectrice d'énergie lumineuse pour le photosystème II (PSII, PS680). En plus de la membrane plasmique, les cellules sont entourées d'une paroi composée de peptidoglycane et de lipopolysaccharides (LPS) dont la structure est similaire à celle des bactéries non photosynthétiques. On peut observer de nombreuses couches

de membranes internes correspondant à des invaginations de la membrane plasmique formant des thylakoïdes (du grec *thylakos*, sac, et *oides*, semblable). Contrairement à ceux des microalgues, ils ne forment pas de grana à l'intérieur d'un organe qualifié de chloroplaste. Ce sont sur ces thylakoïdes que reposent les phycobilisomes des Cyanobactéries. Les Cyanobactéries peuvent stocker des réserves carbonées sous la forme de glycogène. Les cellules possèdent un nucléoplasme, organe contenant l'ADN de la cellule (**Figure 2c**). Certaines Cyanobactéries, qualifiées de diazotrophiques, ont la particularité de pouvoir réduire l'azote atmosphérique ( $N_2$ ) en  $NH_3$  et à l'utiliser comme source d'azote.



**Figure 1** : Observations microscopiques de différentes morphologies de Cyanobactéries. Chroococcales : (a) *Chroococcus subnudus*, (b) *Chroococcus limneticus*, (c) *Cyanothece aeruginosa*, (d) *Snowella litoralis*, (e) *Microcystis aeruginosa*. Pleurocapsales : (f) *Pleurocapsa minor*. Oscillatoriales : (g) *Planktothrix agardhii*, (h) *Limnothrix redekei*, (i) *Arthrospira jenneri*, (j) *Johanseninema constrictum*, (k) *Phormidium* sp., (l) et (m) *Oscillatoria* sp., (n) *Schizothrix* sp., (o) *Tolypothrix* sp., (p) *Katagnymene accurata*., Nostocales : (q) *Dolichospermum planctonicum*, (r) *Dolichospermum* sp., (s) *Nostoc* sp., (t) *Nodularia moravica*. Stigonematales : (u) *Stigonema* sp. 10  $\mu$ m, (v) *Stigonema* sp. 20  $\mu$ m (Dvořák *et al.*, 2015).



**Figure 2 :** Schémas des cellules de (a) Chlorophyta, (b) Rhodophyta et (c) Cyanobactérie (Pignolet *et al.*, 2013).

Ces microorganismes ont été capables de coloniser l'entièreté des milieux aquatiques (milieux marins et eau douce). Elles sont également présentes dans les milieux extrêmes comme les sources chaudes, la glace, le désert, les lacs acides, etc... C'est dans les eaux douces que l'on retrouve la plus grande diversité d'espèces. Elles possèdent plusieurs mécanismes de division cellulaire :

➤ la division cellulaire simple consiste en une scission binaire de la cellule mère en deux cellules filles. Les nouvelles cellules formées peuvent coloniser deux zones distinctes.

➤ la fragmentation, qui consiste en une séparation d'une colonie en différentes portions. Chaque fragment forme ainsi une nouvelle colonie. Ce phénomène s'apparente à celui de l'hormogonie que l'on retrouve au sein des colonies exclusivement filamenteuses. Certaines portions du filament peuvent se séparer et en former de nouveaux, notamment lorsque les cellules accumulent des réserves.

➤ l'endospore au cours de laquelle la cellule va se diviser à plusieurs reprises en gardant les cellules filles nouvellement formées internalisées. Ce phénomène est utilisé par ces organismes pour résister à des conditions extrêmes et notamment à des températures extrêmes (fortes et basses).

Au départ, la classification des Cyanobactéries réalisée uniquement sur la base des critères morphologiques les divisait en 5 ordres : I (Chroococcales), II (Pleurocapsales), III (Oscillatoriales), IV (Nostocales) et V (Stigonematales) (**Castenholz *et al.*, 2001**). Les Cyanobactéries des ordres I et II sont des coccoïdes unicellulaires. Les Chroococcales se divisent par scission binaire, tandis que les Pleurocapsales peuvent produire des baeocytes, petites cellules facilement dispersables semblables à des spores. Les Cyanobactéries des ordres III, IV et V forment des filaments de complexités morphologiques variables. Les Oscillatoriales sont uniquement constituées de cellules végétatives, alors que celles appartenant aux Nostocales et Stigonematales peuvent se différencier en hétérocystes (cellules qui se spécialisent dans la fixation de l'azote dans des conditions aérobies) ou akinetes (cellules très résistantes qui survivent aux stress environnementaux tels que le froid et la dessiccation) (**Tomitani *et al.*, 2006**). Dans un second temps, la taxonomie des Cyanobactéries a été radicalement transformée avec notamment l'introduction de la microscopie électronique et l'arrivée de la biologie moléculaire. A l'heure actuelle, on dénombre 8 ordres, représentant près de 300 genres, dont plus



de 50 ont été décrits depuis l'année 2000 (Mai *et al.*, 2018). La Figure 3 présente la nouvelle classification des Cyanobactéries.

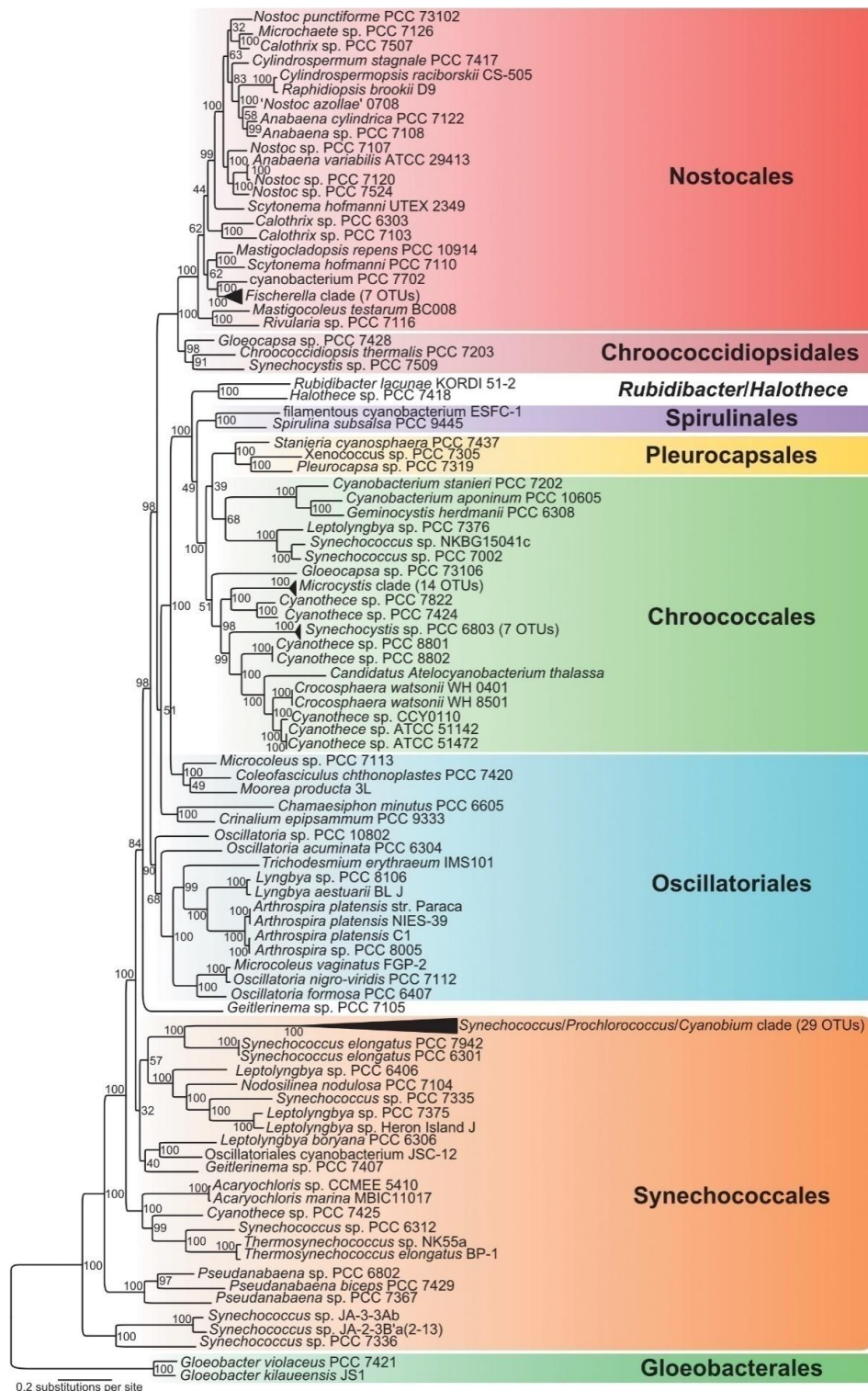


Figure 3 : Arbre phylogénétique des Cyanobactéries (Komarek *et al.*, 2014).

## 1.1.2 Caractéristiques générales des microalgues

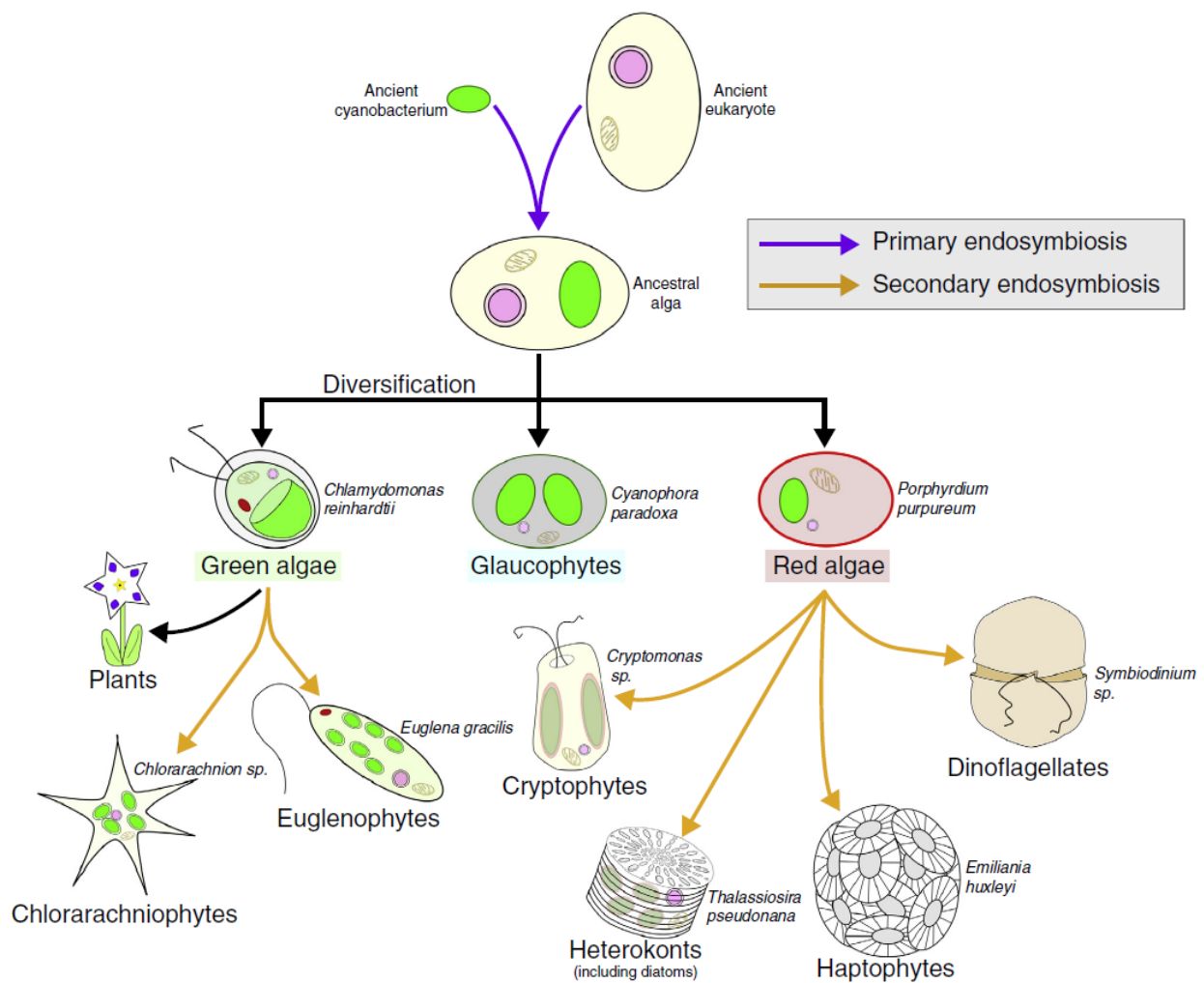
Il existe des microalgues de tailles et de formes variées. Présentes majoritairement dans les milieux aquatiques (marins et eau douce), ces organismes constituent le phytoplancton. La majorité des microalgues sont dites photoautotrophes ou autotrophes, c'est-à-dire qu'elles produisent leur propre matière organique par réduction de matières inorganiques grâce au processus de photosynthèse. L'énergie lumineuse est convertie en énergie chimique, ce qui permet aux microalgues de transformer le CO<sub>2</sub> atmosphérique en glucides et de relarguer de l'O<sub>2</sub>. Cependant, certaines sont capables de se développer en absence de lumière. Ces microalgues pour qui la photosynthèse n'est pas obligatoire sont qualifiées d'organismes hétérotrophes facultatifs car elles sont en mesure d'utiliser une source carbonée d'origine organique pour leur développement.

### 1.1.2.1 Une diversité de familles et d'espèces

Les microalgues sont des organismes extrêmement diversifiés. Le nombre d'espèces est estimé entre 200 000 et 1 000 000 (**Ebenezer *et al.*, 2012**). A ce jour seules 30 000 ont été caractérisées et une dizaine sont exploitées industriellement (**Cheng & Ogden, 2011**). Les microalgues constituent un groupe polyphylétique car elles ne possèdent pas un ancêtre commun unique. Bien qu'elles soient apparues au cours de l'évolution indépendamment les unes des autres au sein de grands groupes phylogéniques, il est possible de toutes les regrouper sous la mention d'algue au sens large, et plus précisément de microalgue puisqu'elles possèdent des caractéristiques communes qui leurs sont propres (**Not *et al.*, 2012**). Des études ont permis de faire la distinction de sous familles sur la base de critères morphologiques, biochimiques et physiologiques spécifiques (organites, enveloppes cellulaires, cycle de vie, composition pigmentaire ou encore le mode de stockage de l'énergie carbonée). Cette classification est amenée à évoluer en raison d'une part, des améliorations des techniques d'analyses des données moléculaires issues du séquençage des acides nucléiques, mais également du fait de l'identification de nouvelles souches.

Les microalgues ont émergé plus tardivement que les Cyanobactéries et sont issues d'une succession d'endosymbioses (**Figure 4 ; Keeling, 2013**). L'endosymbiose primaire a permis la formation des lignées des algues vertes (Chlorophyta), rouges (Rhodophyta) et Glaucophyta *via*

la phagocytose d'une Cyanobactérie ancestrale. Cette bactérie est devenue un chloroplaste, donnant ainsi naissance aux premiers organismes photosynthétiques eucaryotes, auxquels sont rattachés les végétaux supérieurs. Des endosymbioses secondaires ont ensuite eu lieu entre deux organismes eucaryotes photosynthétiques, donnant ainsi naissance aux Euglenophyta et Chlorarachniophyta depuis les Chlorophyta, et aux Cryptophyta, Heterokonta (ou Ochrophyta), Haptophyta et Dinophyta depuis les Rhodophyta. Des endosymbioses tertiaires ont également eu lieu. Celle entre un Heterokonta et un Dinophyta donna naissance aux Bacillariophyta. La description des phyla majeurs des microalgues fait l'objet des paragraphes qui suivent.



**Figure 4 :** Principaux événements endosymbiotiques au cours de l'évolution des plastes et de la phylogénie des principaux groupes de microalgues (Cooper & Smith, 2015).

### 1.1.2.1.1 Le royaume des Plantes

#### 1.1.2.1.1.1 Le phylum des Chlorophyta

Le phylum des Chlorophyta (ou Viridiplantae) regroupe l'ensemble des organismes vivants communément qualifiés de « plantes vertes ». Ce phylum est divisé en deux infra-règnes : les Streptophyta qui regroupent toutes les plantes terrestres (ou Embryophyta) et certaines algues d'eau douce (Charophyta), et les Chlorophyta *stricto sensu* qui incluent certaines algues d'eau douce et toutes les algues marines (De Clerck *et al.*, 2012). Les Chlorophyta et les Streptophyta contiennent 3 000 et 13 000 espèces, réparties en 11 et 2 classes, respectivement (Leliaert *et al.*, 2012). Les organismes de ces phyla possèdent des chloroplastes à double membrane (Figure 2a). Leurs plastes sont colorés en vert par les Chl *a* et Chl *b*, auxquelles sont associés des carotènes (caroténoïdes non oxygénés), des xanthophylles (caroténoïdes), et parfois de l'astaxanthine comme chez *Chlainomonas* sp. (Remias *et al.*, 2016). Ces microalgues possèdent, en fonction des espèces, des métabolismes photoautotrophe, photohétérotrophe ou chimiohétérotrophe. Comme pour les plantes supérieures, la photosynthèse permet la formation de réserves énergétiques (amidon et lipides). Les Chlorophyta ont été décrits dans une multitude d'habitats. Même si certaines espèces peuvent vivre et se multiplier en milieu non aqueux, la plupart se développent en eau douce ou en milieu marin. La classification des Chlorophyta est présentée dans la Figure 5. Elle a été établie à l'aide de 132 séquences d'ADN codant pour l'ARN ribosomique 18S (ARNr 18S) extraites de la base de données Protist Ribosomal Reference (PR<sup>2</sup>) (Guillou *et al.*, 2013).



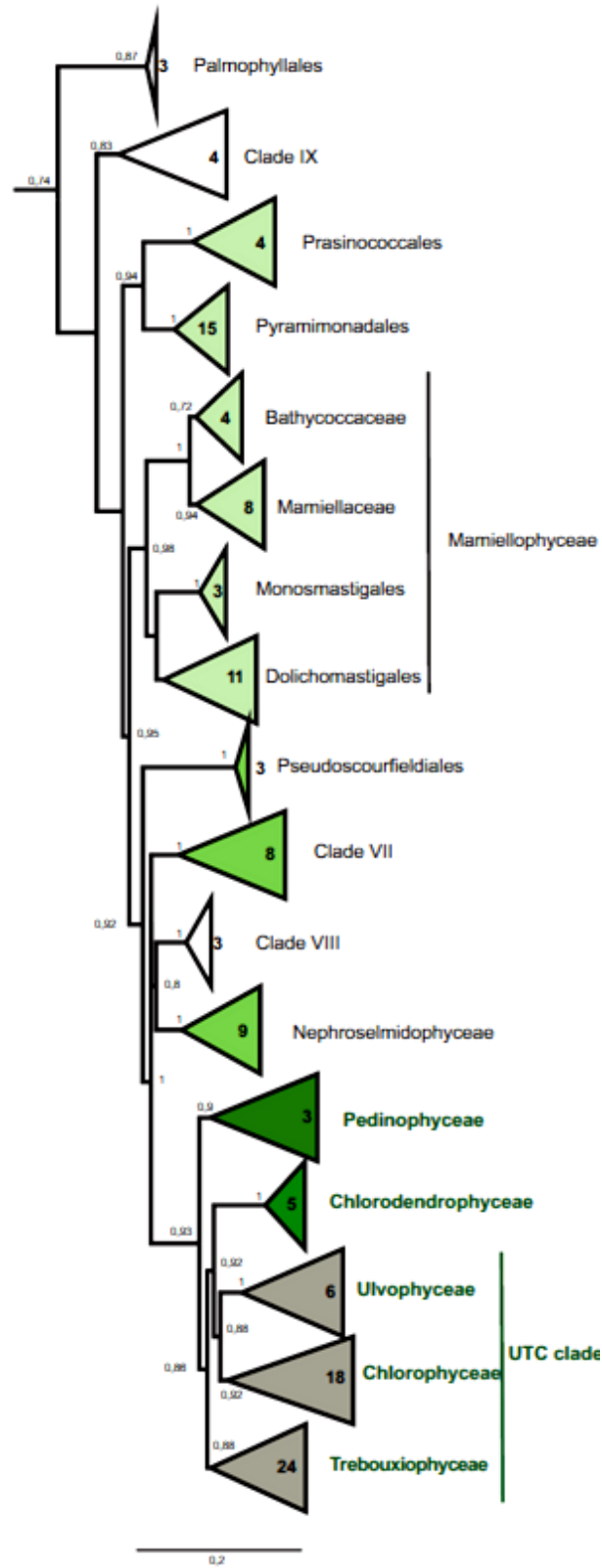


Figure 5 : Arbre phylogénétique des Chlorophyta (Tragin *et al.*, 2016).

#### 1.1.2.1.1.2 Le phylum des Rhodophyta

Les algues rouges (Rhodophyta) sont un groupe monophylétique comprenant des macroalgues et des microalgues. Il est constitué d'environ 700 genres pour approximativement 10 000 espèces (7 250 enregistrées dans Algaebase, base de données de référence pour la communauté scientifique travaillant sur les microalgues et les Cyanobactéries, <http://www.algaebase.org/>) (Kraft & Woelkerling, 1990 ; Pfister *et al.*, 1997). Ces algues sont divisées en deux sous phyla (Cyanidiophytina et Rhodophytina) et 6 classes, d'après Yoon *et al.* (2006) et Le Gall & Saunders (2007). La classification a été retravaillée tout récemment par Yoon *et al.* (2017) (Tableau 1). Ces microalgues ont des caractéristiques spécifiques : i) absence de stade flagellé lors de leur cycle de vie, ii) présence de pigments accessoires, iii) chloroplastes avec des thylakoïdes uniques et iv) un PS de réserve spécifique qualifié d'amidon floridéen (ou glycogène floridéen ou semi-amylopectine). Les pigments identifiés chez ces organismes sont la Chl *a* et parfois la chlorophylle *d* (Chl *d*), mais aussi des pigments accessoires tels que la phycoérythrine et l'allophycocyanine, des  $\alpha$ - et  $\beta$ -carotènes, la zéaxanthine et d'autres xanthophylles dont la lutéine (Metting, 1996). Ces microalgues possèdent un pyrénéoïde (structure cellulaire contenant les enzymes responsables de la photosynthèse) au sein du chloroplaste. L'appareil de Golgi est généralement associé aux mitochondries. De plus, les Rhodophyta ont la particularité d'être entourées d'un mucilage complexe (Figure 2b).

**Tableau 1, partie 1** : Classification des Rhodophyta (d'après **Yoon *et al.*, 2017**).

---

**Royaume Plantae** Haeckel

**Phylum Rhodophyta** Wettstein

**Sous-phylum Cyanidiophytina** Yoon, Müller, Sheath, Ott, et Bhattacharya

**Classe Cyanidiophyceae** Merola, Castaldo, De Luca, Gambardella, Musacchio, et Taddei

**Ordre Cyanidiales** Christensen

**Sous-phylum Rhodophytina** Yoon, Müller, Sheath, Ott, et Bhattacharya

**Classe Bangiophyceae** Wettstein

**Ordre Bangiales** Nägeli

**Classe Compsopogonophyceae** Saunders et Hommersand

**Ordre Compsopogonales** Schmiz in Engler et Prantl

**Ordre Erythropeltidales** Garbary, Hansen, et Scagel

**Ordre Rhodochaetales** Bessey

**Classe Florideophyceae** Cronquist

**Sous-classe Hildenbrandriophycidae** Saunders et Hommersand

**Ordre Hildenbrandiales** Poeschel et Cole

**Sous-classe Nemeliophycidae** Christensen

**Ordre Acrochaetales** Feldmann

**Ordre Balbianiales** Shearh et Müller

**Ordre Balliales** Choi, Kraft, et Saunders

**Ordre Batrachospermales** Poeschel et Cole

**Ordre Colaconematales** harper et Saunders

**Ordre Entwisleiales** Scott, Saunders, et Kraft

**Ordre Nemaliales** Schmitz

**Ordre Palmariales** Guiry et Irvine

**Ordre Rhodachlyales** Saunders, Clayton, Scott, West, Karste, et West

**Ordre Thoreales** Müller, Sherwood, Poeschel, Gutell, et Sheath

**Sous-classe Corallinophycidae** Le Gall et Saunders

**Ordre Corallinales** Silva et Johansen

**Ordre Hapalidiales** Nelson, Sutherland, Farr, et Yoon

**Ordre Rhodogorgonales** Fredericq, Norris, et Poeschel

**Ordre Sporolithales** Le Gall, Payri, Bittner, et Saunders

---

**Tableau 1, partie 2** : Classification des Rhodophyta (d'après **Yoon *et al.*, 2017**).

---

**Royaume Plantae** Haeckel

**Phylum Rhodophyta** Wettstein

**Sous-phylum Rhodophytina** Yoon, Müller, Sheath, Ott, et Bhattacharya

**Classe Florideophyceae** Cronquist

**Sous-classe Ahnfeltiophycidae** Saunders et Hommersand

**Ordre Ahnfeltiales** Maggs et Pueschel

**Ordre Pihellales** Huisman, Sherwood, et Abbott

**Sous-classe Rhodymeniophycidae** Saunders et Hommersand

**Ordre Acrosymphytales** Withall et Saunders

**Ordre Bonnemaisoniales** Feldmann et Feldm.-Maz

**Ordre Ceramiales** Oltmanns

**Ordre Gelidiales** Kylin

**Ordre Gigartinales** Schmitz

**Ordre Gracilariales** Fredericq et Hommersand

**Ordre Halmeniales** Saunders et Kraft

**Ordre Nemastomatales** Kylin

**Ordre Peyssonneliales** Kravesky, Fredericq, et Norris

**Ordre Plocamiales** Saunders et Kraft

**Ordre Rhodymeniales** Schmitz

**Ordre Sebdeniales** Withall et Saunders

**Classe Porphyridiophyceae** Yoon, Müller, Sheath, Ott, et Bhattacharya

**Ordre Porphyridiales** Kylin ex Skuja

**Classe Rhodellophyceae** Cavalier-Smith

**Ordre Dixoniellales** Yokoyama, Scott, Zuccarello, Kajikawa, Hara, et West

**Ordre Glaucospharales** Yang, Scott, Yoon, et West

**Ordre Rhodellales** Yoon, Müller, Sheath, Ott, et Bhattacharya

**Classe Stylonematophyceae** Yoon, Müller, Sheath, Ott, et Bhattacharya

**Ordre Rufusiales** Zuccarello et West

**Ordre Stylonematales** Drew

---

### 1.1.2.1.3 Le phylum des Charophyta

Les Charophyta font partie de la lignée qui a donné naissance aux plantes terrestres mais s'en distinguent par l'absence d'un certain nombre de caractéristiques, et notamment par leur cycle de vie. Ensemble, les plantes terrestres et les Charophyta forment un groupe monophylétique frère d'une seconde lignée majeure d'algues vertes, les Chlorophyta (**Leliaert *et al.*, 2012**). Les pigments identifiés chez ces organismes sont la Chl *a* et *b*. Les classes majeures sont les Klebsormidiophyceae, les Charophyceae, les Coleochaetophyceae et les Zygnematophyceae, qui comptent respectivement 40, 750, 34, 3751 noms d'espèces (**Guiry, 2012 ; Guiry *et al.*, 2014**). Les classes des Chlorokybophyceae et Mesostigmatophyceae sont quant à elles beaucoup moins représentées (**McCourt *et al.*, 2004 ; Leliaert *et al.*, 2012**).

### 1.1.2.1.2 Le royaume des Chromista

Ce royaume est en évolution permanente. Au départ il comprenait les Ochrophyta, les algues brunes (Phaeophyta), les diatomées (Bacillariophyta), les algues brunes-dorées (Chrysophyta), les Oomycetes et les Dictyochales (**Cavalier-Smith, 1993**). Le royaume a ensuite été divisé en 5 phyla : Cryptophyta, Sagenista, Ochrophyta, Bigyra et Haptophyta (**Cavalier-Smith, 1998**). La classification des Chromista a de nouveau évolué en 2010 grâce aux données moléculaires et aux informations dérivées d'arbres multigéniques (**Cavalier-Smith, 2010**). Elle comprenait alors 9 phyla : Ochrophyta, Bigyra, Miozoa, Ciliophora, Cercozoa, Retaria, Haptophyta, Cryptista et Heliozoa (**Sym & Maneveldt, 2011**). A ce jour, la classification de ce royaume compte 8 phyla : Miozoa, Ciliophora, Gyrista (incluant les Ochrophyta), Bigyra, Cercozoa, Retaria, Cryptista et Haptista (incluant les Haptophyta) (**Cavalier-Smith, 2018**). Les phyla majoritaires sont ceux des Haptophyta, Ochrophyta et Miozoa.

#### 1.1.2.1.2.1 Le phylum des Haptophyta

La grande majorité des microalgues de ce phylum sont marines, unicellulaires strictes ou vivant en colonies, même si certaines espèces sont présentes en eau douce. Elles ont une forme ronde ou oblongue et sont biflagellées. Toutes contiennent un ou deux chloroplastes possédant un pyrénoïde. L'appareil de Golgi est situé près des corps basaux flagellaires et de l'haptonème (appendice filiforme situé entre les flagelles) (**Edwardsen *et al.*, 2000**). Elles disposent de Chl *a*

et chlorophylle *c* (Chl *c*) et de divers caroténoïdes (fucoxanthine,  $\beta$ -carotène, diadinoxanthine (Seoane *et al.*, 2009). *Isochrysis* aff. *Galbana* et *Pavlova salina* sont les deux exemples d'espèces d'Haptophyta utilisées en alimentation animale (pisciculture) (Heimann & Huerlimann, 2015).

#### 1.1.2.1.2.2 Le phylum des Ochrophyta

Il s'agit d'algues unicellulaires possédant deux flagelles et vivant essentiellement en milieu marin. La photosynthèse est réalisée à l'aide des Chl *a* et Chl *c* et leur réserve glucidique prend la forme de chrysolaminarine, un  $\beta$ -(1,3)-(1,6)-D-glucane. Ce phylum est extrêmement varié. Sa classification phylogénétique est présentée dans la **Figure 6**. Les classes majoritaires sont les Bacillariophyceae, les Phaeophyceae et les Cryptophyceae.

##### 1.1.2.1.2.2.1 La classe des Bacillariophyceae

Aussi appelées diatomées, ces microorganismes unicellulaires photosynthétiques constituent le groupe dominant des microalgues. Elles produisent à elles seules près du quart de l'O<sub>2</sub> que nous respirons. Actuellement, plus de 16 000 espèces sont référencées dans Algaebase. Les diatomées se trouvent dans des environnements d'eau douce et marins et sont principalement unicellulaires, même si certaines forment des colonies. La particularité de cette classe est la production d'une frustule siliceuse recouvrant la cellule. Les diatomées *Chaetoceros muelleri*, *Skeletonema* spp. et *Thalassiosira pseudonana* sont cultivées pour des utilisations en pisciculture (Paul *et al.*, 2012).

##### 1.1.2.1.2.2.2 La classe des Chrysophyceae

Cette classe de microalgues compte 7 ordres dans lesquels sont répartis près de 700 espèces (données Algaebase). Ces organismes possèdent deux flagelles, un grand faisant la taille de la cellule et un plus petit faisant environ 1/3 de la cellule. Les Chrysophyceae ont un noyau étendu et proche des corps basaux flagellaires. La membrane externe du noyau est généralement rapprochée de la membrane externe du réticulum endoplasmique (RE) du chloroplaste. Il y a habituellement un ou deux chloroplastes, contenant un pyrénéoïde, par cellule. Tout comme les Haptophyta, l'appareil de Golgi est situé près des corps basaux flagellaires (Hibberd, 1976).

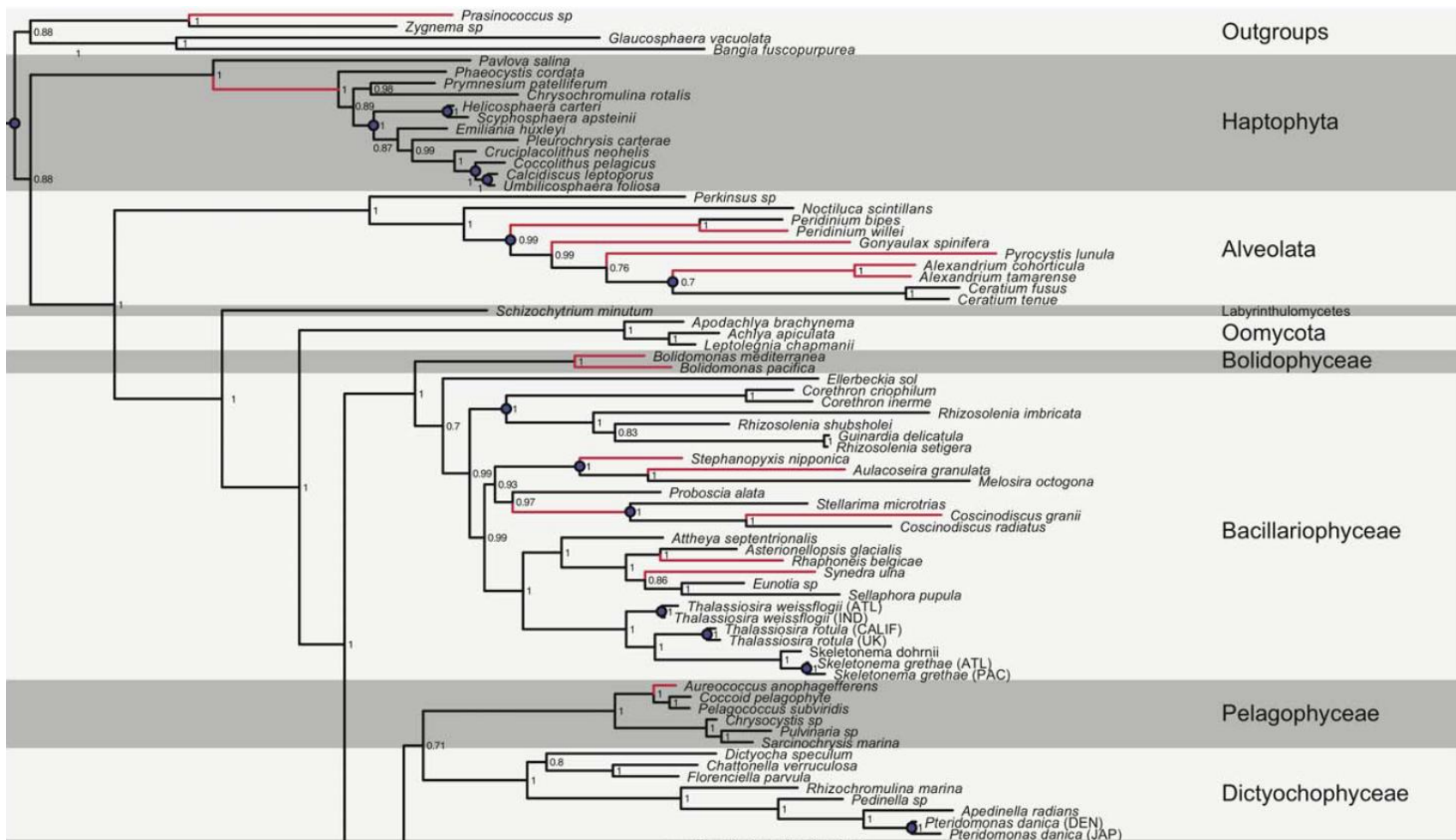


Figure 6, partie 1 : Classification des Ochrophyta (Brown & Sorhannus, 2010).

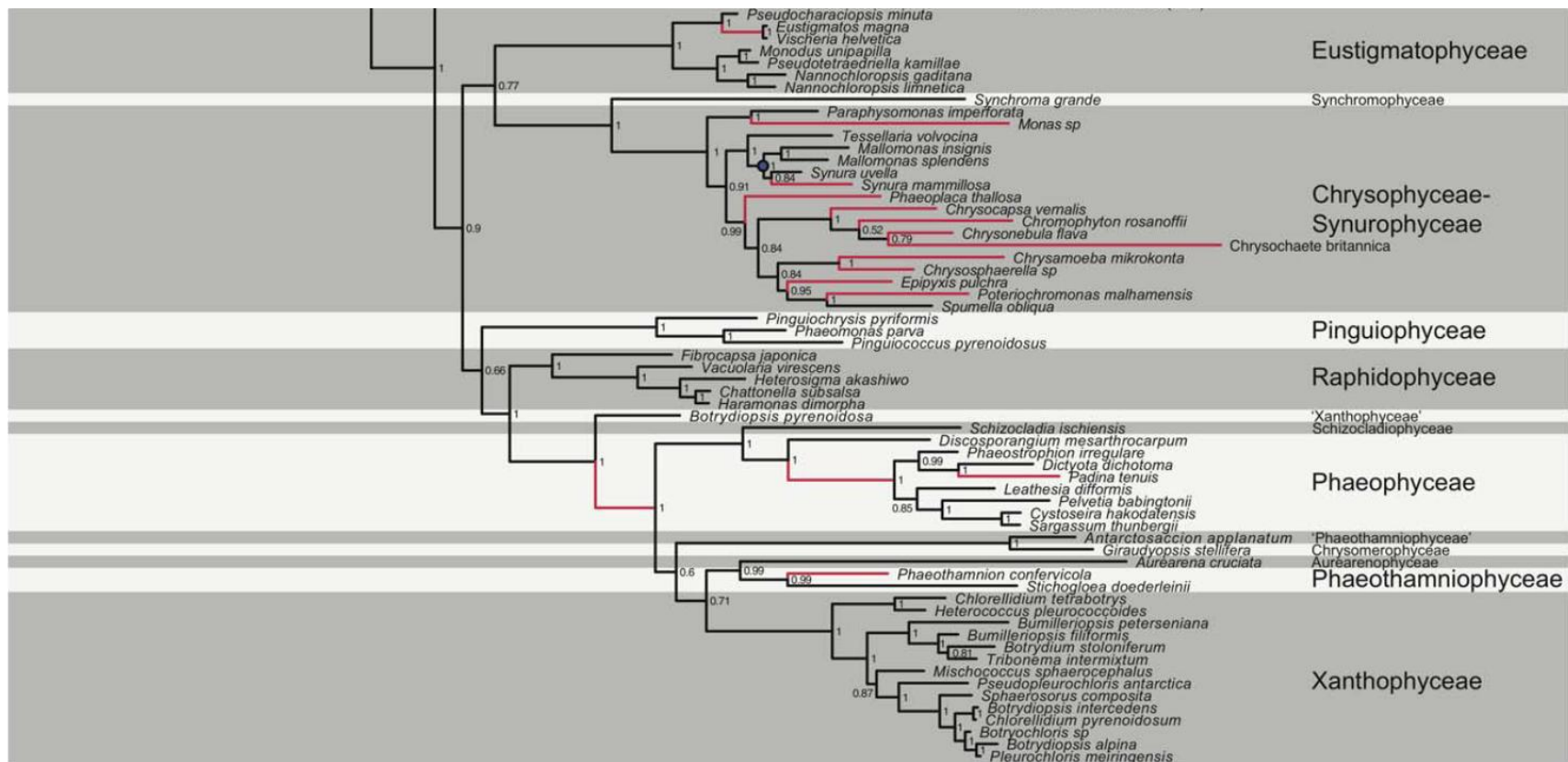


Figure 6, partie 2 : Classification des Ochrophyta (Brown & Sorhannus, 2010).



### **1.1.2.1.2.2.3 La classe des Phaeophyceae**

Les Phaeophyceae, ou algues brunes contiennent 18 ordres dans lesquels sont répartis un peu plus de 2000 espèces (**Silberfeld *et al.*, 2014**). Ces algues possèdent de la Chl *a* et Chl *c* et un pigment surnuméraire, la fucoxanthine (caroténoïde). La plupart vivent en milieu marin et sur les côtes rocheuses à faible profondeur.

### **1.1.2.1.2.3 Le phylum des Miozoa**

Les Miozoa sont des organismes unicellulaires, majoritairement marins même si quelques espèces d'eau douce ont été identifiées. Seulement la moitié des microalgues présentes dans ce groupe sont photosynthétiques. Les autres sont hétérotrophes et dépourvues de chloroplastes (**Heimann & Huerlimann, 2015**). Ce phylum est composé de 8 classes, dont celle des Dinophyceae. Il s'agit de la classe la plus représentée avec environ 550 genres et près de 4 000 espèces (données Algaebase). Les Dinoflagellés possèdent deux flagelles. Comme les Chlorophyta, leur réserve énergétique carbonée prend la forme de granules d'amidon au sein du cytoplasme.

## **2. Culture des microalgues**

### **2.1 Effet des éléments constitutif du milieu de culture**

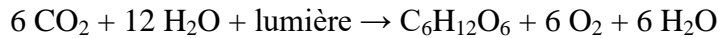
Comme la très grande majorité des organismes vivants sur Terre, les microalgues et Cyanobactéries sont composées principalement de protéines, de glucides et de lipides. Pour pouvoir se multiplier, les cellules ont besoin de vivre dans un environnement adapté et riche en divers nutriments nécessaires à l'élaboration des constituants cellulaires.

#### **2.1.1 Le Carbone**

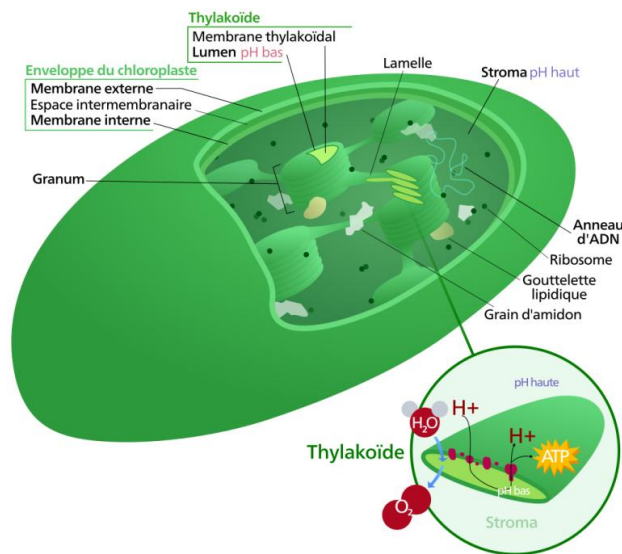
Le carbone (C) est l'élément chimique essentiel au bon développement de tous les organismes vivants. Dans la nature, le substrat carboné peut être retrouvé sous diverses formes, qui peuvent être résumées en deux grandes catégories : le carbone inorganique qui correspond au CO<sub>2</sub> et le carbone organique issus de la dégradation de la matière biologique environnementale (principalement des glucides tel que le glucose).

### 2.1.1.1 La Photosynthèse

La principale source de carbone pour les organismes photosynthétiques est le CO<sub>2</sub> atmosphérique. Son utilisation par les microalgues est possible grâce au processus de photosynthèse. Le bilan global de la photosynthèse peut se résumer par la réduction de 6 molécules de CO<sub>2</sub> par 12 molécules d'H<sub>2</sub>O en utilisant l'énergie lumineuse :



Cette conversion d'énergie lumineuse en énergie chimique ou biochimique se décompose en deux phases distinctes reliées par des intermédiaires communs : la phase lumineuse (ou claire, ou photochimique) et la phase obscure (ou sombre, ou biochimique). Ces phases réactionnelles se déroulent au sein du chloroplaste des microalgues. Cet organelle intracellulaire en forme de disque possède son propre matériel génétique sous forme d'ADN circulaire, porteur des gènes codant pour les protéines chloroplastiques. L'enveloppe du chloroplaste est composée de deux membranes. La première est la membrane externe composée d'une double couche de phospholipides perméable aux molécules polaires. La seconde est la membrane interne entourant le stroma, zone interne du chloroplaste contenant le matériel génétique, des ribosomes, des gouttelettes lipidiques, des grains d'amidon et des thylakoïdes. L'empilement de ces derniers constitue un granum. C'est au sein de ces thylakoïdes que se déroulent l'ensemble des réactions de la phase lumineuse de la photosynthèse (**Figure 7**).

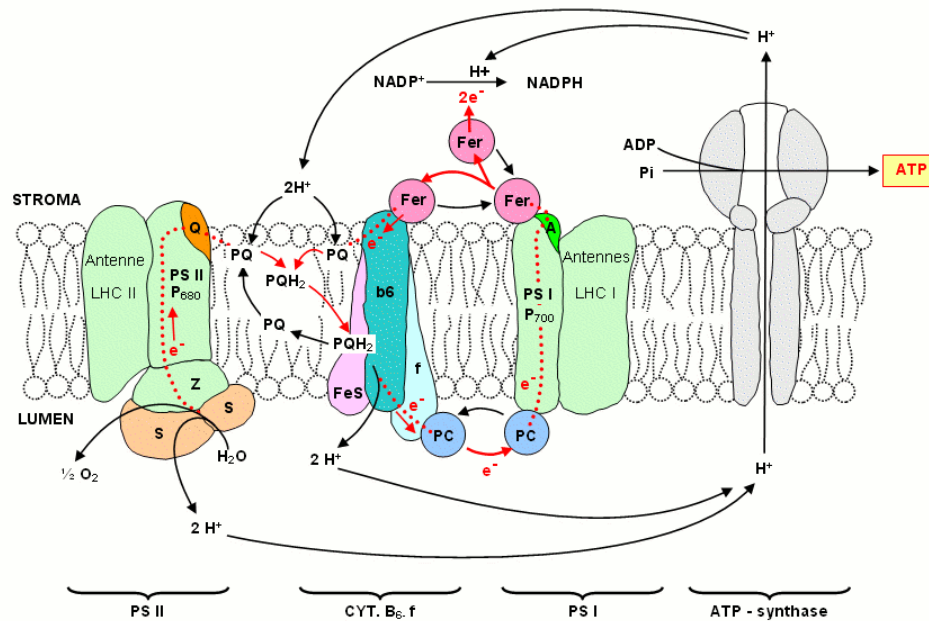


**Figure 7** : Schéma d'un chloroplaste.

La phase lumineuse se déroule exclusivement en présence de lumière. Elle implique des réactions photochimiques qui vont permettre la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique, notamment *via* la phosphorylation de l'adénosine diphosphate (ADP) en adénosine triphosphate (ATP) et la réduction du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH, H<sup>+</sup>). Cette dernière réaction est catalysée par le photosystème I (PSI, PS700). Les PSI et PSII sont des complexes où sont associés les pigments qui récoltent la lumière et les enzymes qui catalysent des réactions. Chaque photosystème possède une antenne collectrice de l'énergie lumineuse composée de pigments et un centre réactionnel composé de deux molécules de Chl *a* dont le rôle est de transférer cette énergie lumineuse vers un accepteur primaire d'électron. Le PSII dispose également d'un complexe d'oxydation de l'eau.

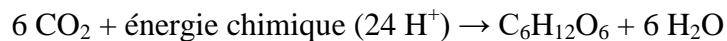
Dans un premier temps l'énergie lumineuse circule depuis les différents pigments collecteurs (chlorophylles et pigments surnuméraires) vers la Chl *a* du PSII pour la libération d'électrons (phase lumineuse). Une fois que l'énergie lumineuse a atteint la Chl *a*, celle-ci passe à un état excité et expulse alors un électron. Les électrons issus de deux excitations successives sont ensuite transportés *via* des coenzymes du PSII jusqu'à un accepteur primaire mobile de la membrane du thylakoïde, la plastoquinol (forme réduite de la plastoquinone). Le PSII sous cet état oxydé est très réactif et va catalyser l'oxydation de l'eau *via* une de ses sous unités : le complexe d'oxydation de l'eau, qui est un cluster oxométallique constitué de quatre cations de manganèse dont le nombre d'oxydation varie de +3 à +5, et d'un ion Ca<sup>2+</sup>. Les quatre électrons issus de l'oxydation réduiront la chlorophylle P680 *via* la chaîne latérale de la tyrosine D1-Y161. La plastoquinol qui diffuse librement dans la membrane du thylakoïde va réduire le cytochrome b6-f, qui les transmet à son tour à un transporteur mobile de la membrane du thylakoïde, la plastocyanine (protéine à cuivre) qui les transmet au PSI. L'ensemble de ces réactions est rendu possible grâce à une chaîne croissante de potentiels redox depuis le PSII jusqu'au PSI. A noter que le cytochrome b6-f va au cours du transfert des électrons générer un gradient de protons de part et d'autre de la membrane du thylakoïde (la lumière du thylakoïde devient électropositive). L'énergie libre de ce gradient sera utilisée par une ATP synthase qui va phosphoryler de l'ADP en ATP. Ces différentes étapes constituent la chaîne de transport d'électrons (**Figure 8**). Cette libération d'électrons conduit à la formation de NADPH par le PSI au sein du stroma des thylakoïdes *via* un transporteur spécifique appelé la ferrédoxine et à une ferrédoxine/NADP-réductase. Les molécules d'ATP et de NADPH<sub>2</sub> serviront par la suite au cycle de Calvin-Benson

(phase obscure). Il est donc possible d'assimiler les deux photosystèmes à des oxydoréductases qui assurent l'oxydation de l'eau, la création de pouvoir réducteur utilisable par l'anabolisme (NADPH, H<sup>+</sup>) et la création d'un gradient de protons de part et d'autre de la membrane du thylakoïde.



**Figure 8** : Réactions de la photosynthèse au sein du chloroplaste (phase lumineuse).

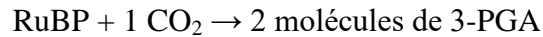
La seconde phase (phase obscure) correspond à une phase biochimique. Cette phase est le siège des réactions permettant la fixation du carbone et la production des molécules glucidiques *via* le cycle de Calvin-Benson situé dans le stroma (**Figure 9**). Ces molécules sont synthétisées grâce à l'utilisation de l'énergie chimique et du potentiel d'oxydoréduction (ATP et NADPH) générés lors de la phase lumineuse grâce à la réaction chimique suivante :



Cette phase qui a lieu dans le stroma du chloroplaste peut être divisée en 3 étapes :

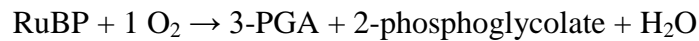
- la première correspond à la phase de fixation du carbone. Trois molécules de CO<sub>2</sub> vont réagir avec la Ribulose-1,5-biphosphate (RuBP) et former 6 molécules de 3-phosphoglycérate (3-PGA). L'enzyme responsable de cette réaction est la Ribulose bis Phosphate Carboxylase Oxygénase (RuBisCO) qui possède deux fonctions catalytiques : carboxylase par fixation du CO<sub>2</sub> et oxygénase par fixation d'O<sub>2</sub> au site actif.

L'étape de carboxylation peut être résumée par l'équation suivante :

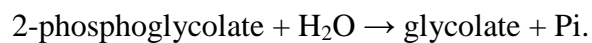


Cette étape correspond à celle précédemment décrite dans le cadre de la phase sombre.

L'étape d'oxygénation (ou photorespiration) peut être résumée par l'équation suivante :



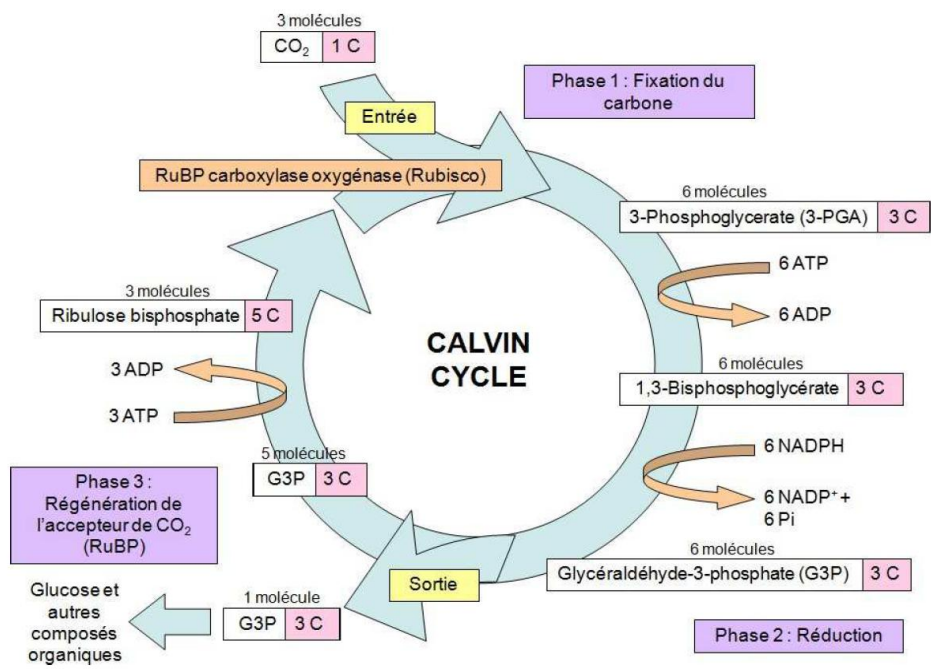
La molécule de 3-PGA va rejoindre le cycle de Calvin-Benson, tandis que le 2-phosphoglycolate est déphosphorylé en glycolate par la phosphoglycolate phosphatase (PGP) et sort du chloroplaste pour être recyclé dans un peroxyosome selon l'équation suivante :



Il y a donc une compétition entre le  $\text{CO}_2$  et l' $\text{O}_2$  pour le même site de fixation (**Portis & Parry, 2007**), et les vitesses des réactions de carboxylation et d'oxygénation sont conditionnées par les concentrations relatives des deux gaz. L'inhibition de la photosynthèse par une forte concentration en  $\text{O}_2$  est appelé effet Warburg (**Turner & Brittain, 1962**). Chez les plantes, la photorespiration représente seulement 25 % des réactions de la RuBP par rapport à la carboxylation. Cela suggère que la fixation du  $\text{CO}_2$  est privilégiée par rapport à l' $\text{O}_2$ , et cela malgré un ratio  $\text{O}_2/\text{CO}_2$  de 500 dans l'atmosphère (**Griffiths, 2006**).

➤ la seconde étape correspond à la réduction des 3-PGA en glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P). Cette étape est catalysée par la phosphoglycérokinase (PGK), puis par le glycéraldéhyde phosphodéshydrogénase (GPDH). Les trioses produits lors de la première étape sont phosphorylés et réduits par l'ATP et le NADPH générés durant la phase lumineuse, ainsi que deux électrons cédés par la molécule de  $\text{NADPH}, \text{H}^+$ . Un sixième du glyceraldéhyde généré va être impliqué dans la production de glucides complexes tels que le glucose-6-phosphate, le saccharose et l'amidon.

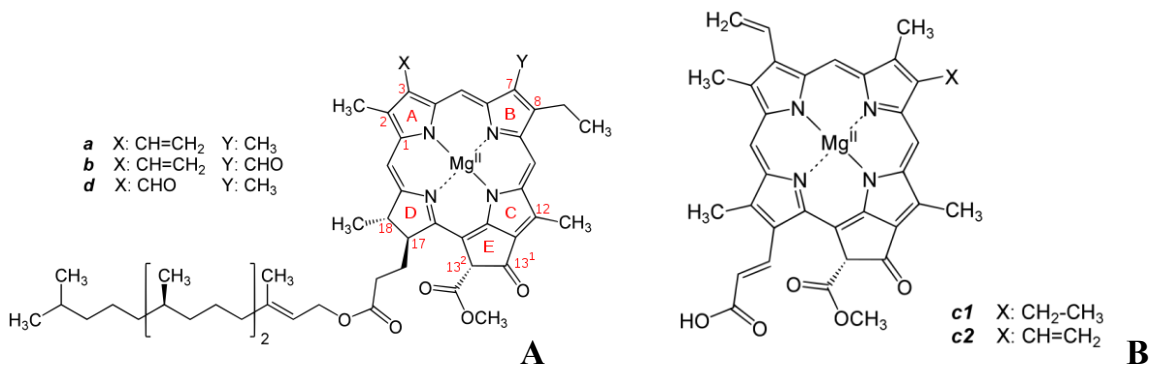
➤ le reste (5/6) servira à régénérer le cycle en RuBP (troisième et dernière étape du cycle).



**Figure 9** : Schéma du cycle de Calvin-Benson (phase obscure) (Boyer, 2009) (d'après Mazliak, 1974).

### 2.1.1.1.1 Les chlorophylles

Les chlorophylles, qui sont les pigments majeurs pour la réalisation de la photosynthèse, sont composées d'un noyau tétrapyrrolique substitué par une chaîne carbonée variable en fonction du type de chlorophylle (Jeffrey & Wright, 2005), et associant de façon covalente un atome de magnésium en son centre. Il existe différentes chlorophylles dont la structure moléculaire varie en fonction des substituants (Figure 10). Ce sont ces substituants, présents sur le squelette tétrapyrrolique qui déterminent les différentes caractéristiques spectrophotométriques des chlorophylles et leur confèrent une forte absorption dans le visible (400-700 nm) et une longueur d'absorption optimale ( $\lambda_{\text{max}}$ ) spécifique (Tableau 2). La Chl *a* est qualifiée de pigment actif car elle est capable de capter mais aussi de convertir l'énergie lumineuse, à contrario des pigments dits surnuméraires (ou accessoires) qui sont uniquement capables de capter les photons et de transférer l'énergie associée à cette absorption (transfert d'excitons) jusqu'au centre réactionnel du photosystème constitué d'une paire de Chl *a*.



**Figure 10** : Structures des (A) chlorophylles *a*, *b* et *d* et des (B) chlorophylles *c*.

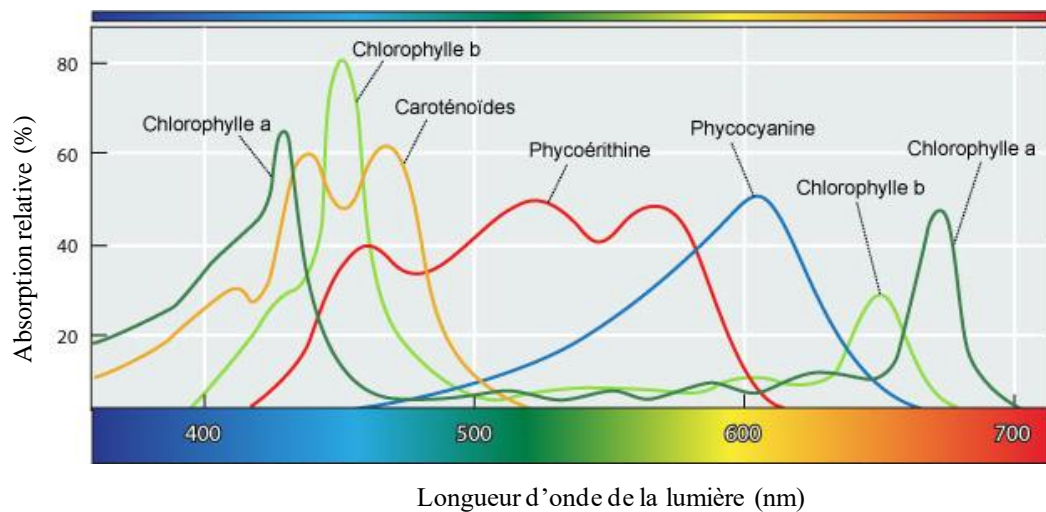
Ces pigments sont les plus représentés dans le monde du vivant car présents chez tous les organismes photoautotrophes. Les chlorophylles décrites chez les organismes photosynthétiques sont les Chl *a*, Chl *b*, Chl *c* et Chl *d* en fonction de l'espèce d'algue considérée. La Chl *a* est présente chez tous les microorganismes photosynthétiques. La Chl *b* est présente chez les Chlorophyta et Charophyta, mais absente chez les Cyanobactéries. Les Chl *c*<sub>1</sub> et *c*<sub>2</sub> sont uniquement présentes chez les Chromista. Les Haptophyta possèdent en plus de la Chl *c*<sub>3</sub>. Enfin, la Chl *d* a été mise en évidence chez des Rhodophyta. Une cinquième chlorophylle (Chl *f*) a été récemment découverte chez les Cyanobactéries par **Chen *et al.* (2010b)**. Sa présence a été démontrée chez la Cyanobactérie *Chroococidiopsis thermalis* (**Nürnberg *et al.*, 2018**).

**Tableau 2** : Longueurs d'ondes absorbées par les différentes chlorophylles.

Chlorophylles	$\lambda_{\max}$
Chlorophylle a	436 et 665 nm
Chlorophylle b	457 et 650 nm
Chlorophylle c1	446 et 630 nm
Chlorophylle c2	448 et 630 nm
Chlorophylle c3	452 et 626 nm
Chlorophylle d	445 et 696 nm
Chlorophylle f	735 nm

### 2.1.1.1.2 Les pigments surnuméraires

Ces pigments sont uniquement capables de capter les photons. Ils permettent aux organismes photosynthétiques d'élargir leur spectre d'absorption dans des régions différentes de celles des chlorophylles (**Figure 11**). Il en existe différents types et la proportion de chacun d'eux au sein des organismes photosynthétiques permet à ces derniers de s'adapter à des conditions d'irradiance variables.



**Figure 11** : Spectre d'absorption des principaux pigments photosynthétiques.

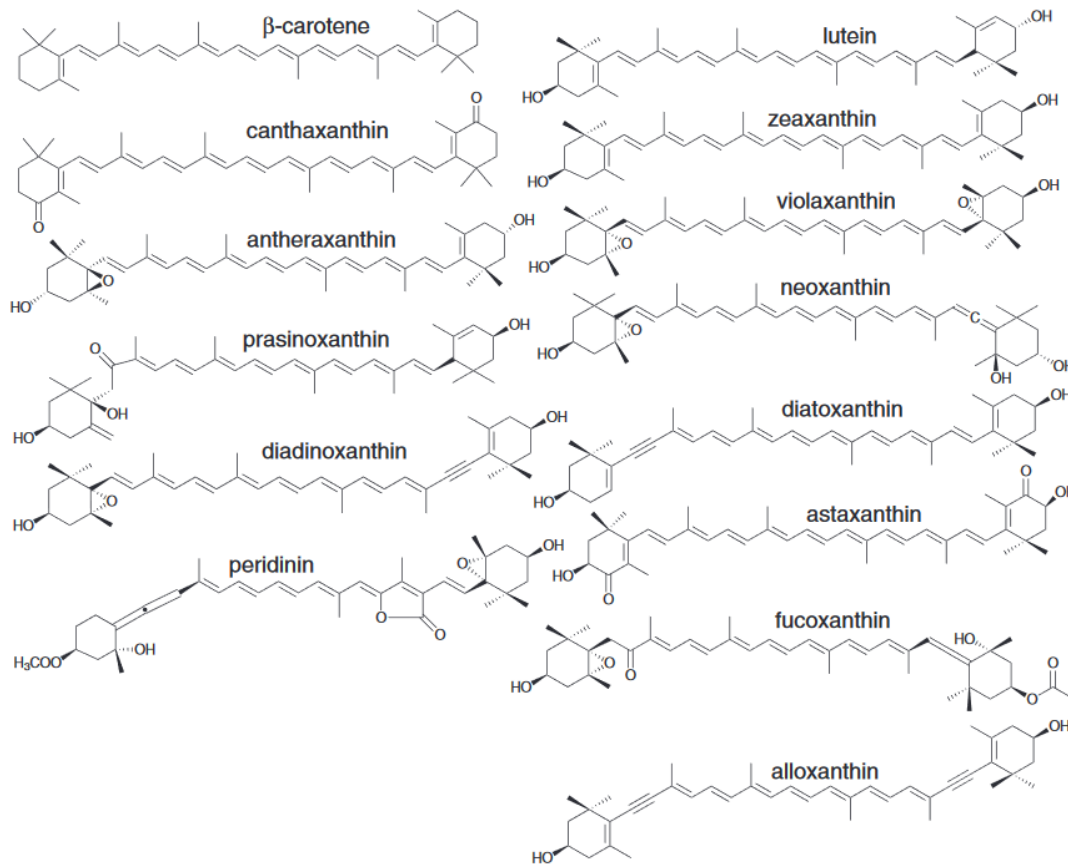
#### 2.1.1.1.2.1 Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments tétraterpéniques principalement linéaires. Ils sont présents chez la quasi-totalité des organismes photoautotrophes, en proportions variables en fonction de l'organisme considéré. La **Figure 12** présente les structures des principaux caroténoïdes des microalgues.

Ces pigments photosynthétiques sont situés dans les membranes du thylakoïde. Les caroténoïdes sont des molécules lipidiques appartenant à la famille des terpènes. Ils font partis de la catégorie des tétraterpènes, car généralement issus de la condensation de 8 unités d'isoprénoïdes. Les caroténoïdes hydrocarbonés appartiennent à la sous famille des carotènes et leurs dérivés oxygénés sont appelés xanthophylles. La couleur est l'élément caractéristique de ces



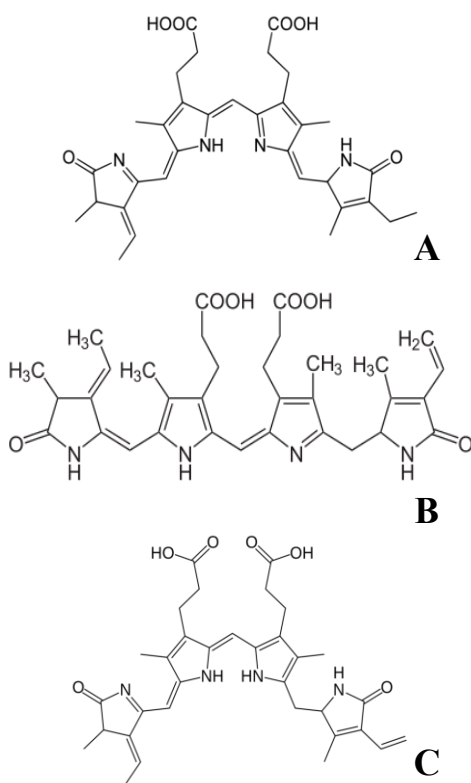
molécules. Elle peut varier du jaune au rouge, en passant par le violet. Ces molécules doivent leur couleur à leur système de doubles liaisons conjuguées créant un chromophore et permettant ainsi l'absorption de la lumière visible entre 400 et 500 nm. L'accumulation de caroténoïdes secondaires est généralement considérée comme une stratégie de survie utilisée par les algues soumises à un stress photo-oxydant ou à d'autres conditions environnementales défavorables (**Hu et al., 2008**). Les plus importants sont le  $\beta$ -carotène (rouge-orange) et la lutéine (jaune). Chez les organismes photosynthétiques, les caroténoïdes interviennent au niveau de l'antenne collectrice qui permet le transfert de l'énergie lumineuse à la Chl *a*, augmentant ainsi l'efficacité de la photosynthèse sur un plus large éventail de longueurs d'ondes.



**Figure 12** : Structures moléculaires des principaux caroténoïdes (**Guaratini et al., 2009**).

### 2.1.1.1.2.2 Les phycobilines

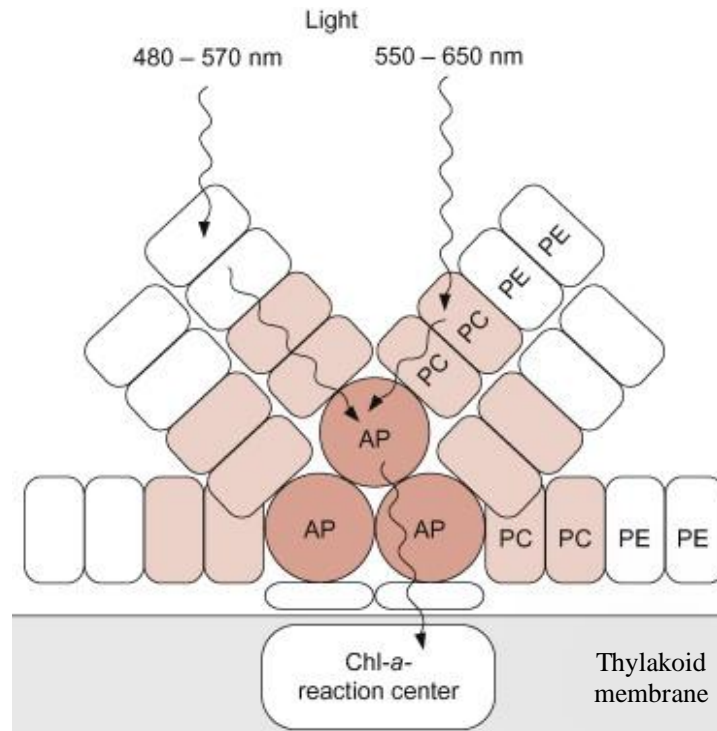
Les phycobilines constituent la seconde classe de pigments accessoires. Elles possèdent une structure protéique associée à un noyau tétrapyrrole, ce qui leur octroie aussi le nom de phycoprotéines ou phycobiliprotéines. Elles sont uniquement présentes au sein des phycobilisomes chez les Rhodophyta, les Cyanobactéries et les Glaucophyta (Larkum, 2016). Il en existe quatre types : l'allophycocyanine, la phycocyanine, la phycoérythrine et la phycoérythrocyanine (Figure 13).



**Figure 13** : Structures des groupements prosthétiques de (A) la phycocyanine, (B) la phycoérythrine et (C) la phycoérythrocyanine.

Ces phycobilines forment un complexe protéique appelé le phycobilisome, de forme semi-discoïdale (Figure 14). Le phycobilisome est constitué d'un centre tricylindrique d'allophycocyanine (AP) à partir duquel sont développés 6 bras constitués de phycocyanine (PC) et phycoérythrine (PE). Ces complexes, extrinsèques à la membrane du thylakoïde sont les principales structures collectrices de la lumière chez ces microorganismes (Kathiresan *et al.*,

2007). La PE est la première à absorber l'énergie lumineuse. Elle va la transférer vers la PC, qui à son tour va la transférer à un accepteur final, l'AP. Cette énergie sera éventuellement transmise à la paire de Chl *a* du centre réactionnel du PSII pour libérer les électrons.



**Figure 14 :** Schéma de la structure et du fonctionnement d'un phycobilisome. AP : allophycocyanine, PC : phycocyanine et PE : phycoérythrine.

### 2.1.1.2 Le Carbone inorganique

Le carbone inorganique sous la forme de  $\text{CO}_2$  est la source de carbone privilégiée par les microalgues. Le  $\text{CO}_2$  est un élément nécessaire pour la photosynthèse et il est généralement admis que la production d'un kilo de microalgues (constituée de C à hauteur de 45-50 % de la masse sèche) absorbe entre 1,65 et 1,8 kg de  $\text{CO}_2$  (Doucha *et al.*, 2005). Il est ainsi conseillé lors de la culture de ces microorganismes d'injecter un air enrichi en  $\text{CO}_2$  afin de favoriser leur croissance (Skjånes *et al.*, 2007). Cependant, le pourcentage de  $\text{CO}_2$  dans l'air nécessaire pour alimenter et améliorer les cultures des microalgues et Cyanobactéries varie en fonction du genre auquel elles appartiennent. *Scenedesmus dimorphus* possède un rendement en biomasse égal à  $0,74 \text{ g.L}^{-1}$  lorsqu'elle est cultivée avec 0,03 % de  $\text{CO}_2$ . Ce rendement est multiplié par un facteur

2 lorsque la concentration en CO<sub>2</sub> est augmentée à 1 %. De plus, aucune amélioration de la production de biomasse n'est observée lorsque ce taux atteint 2 %, suggérant un apport en carbone de 1 % comme optimal pour la croissance (**Vidyashankar et al., 2013**). Dans les mêmes conditions de croissance, les microalgues *Ankistrodesmus convolutes*, *Coelastrum asteroidum* et *Chlorococcum* sp. ont une croissance optimale pour un taux de CO<sub>2</sub> égal à 0,03, 0,03 et 0,5 %, respectivement (**Vidyashankar et al., 2013**). Au-delà de ces valeurs, la production de cellules est stationnaire ou diminue. Ces valeurs seuils qui correspondent à des concentrations critiques en CO<sub>2</sub> varient d'une souche à l'autre. **Yang & Gao (2003)** suggérant qu'elles dépendent de plusieurs paramètres tels que l'affinité des cellules pour ce gaz, l'état physiologique des cellules (phase de croissance), la taille des cellules et aussi la présence d'anhydrase carbonique. L'anhydrase carbonique est une enzyme qui catalyse l'hydratation réversible du CO<sub>2</sub> en acide carbonique puis en bicarbonate (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>).

Certaines microalgues sont capables de se développer à des taux de CO<sub>2</sub> beaucoup plus importants. Ces souches sont dites CO<sub>2</sub>-tolérantes. Par exemple *Desmodesmus* sp. tolère des concentrations en CO<sub>2</sub> comprises entre 0,25 et 10 % avec un optimum autour de 1,5 % (**Brilman et al., 2013 ; Huang et al., 2012**). **Bhola et al. (2011)** ont montré que *Chlorella vulgaris* avait un optimum de croissance pour un apport de CO<sub>2</sub> égal à 4 %, mais cette même espèce peut tolérer des concentrations en CO<sub>2</sub> comprises entre 10 et 30 % (**Hanagata et al., 1992**). D'autres microalgues possèdent un optimum de CO<sub>2</sub> beaucoup plus élevé. C'est le cas de *Scenedesmus obliquus* et *Chlorella pyrenoidosa* qui sont capables de croître à des taux extrêmement variables de CO<sub>2</sub>, compris entre 0,03 et 50 %, avec une croissance optimale observée à 10 % (**Tang et al., 2011**). Une autre microalgue CO<sub>2</sub>-tolérante, *Chlorella* sp., peut se développer à des taux de CO<sub>2</sub> compris entre 10 et jusqu'à 70 % (**Sung et al., 1999**). Cependant, le meilleur taux de croissance est obtenu pour une concentration en CO<sub>2</sub> de 10 % (v/v), ce qui est 7 fois plus important que celui obtenu avec le taux de CO<sub>2</sub> à 70 % (**Sung et al., 1999 ; Yue & Chen, 2005**).

Certaines microalgues sont capables d'adapter leur métabolisme en fonction de la concentration en CO<sub>2</sub>. Par exemple, *Nannochloropsis oculata* accumule de grandes quantités de lipides intracellulaires lorsqu'elle est cultivée avec une supplémentation en CO<sub>2</sub> égale à 2 % mais peut se développer à des taux plus importants (5-15 % de CO<sub>2</sub>) après une étape d'adaptation sous des teneurs en CO<sub>2</sub> plus faibles (**Chiu et al., 2009**). Une nuance doit être cependant apportée. Les

taux de CO<sub>2</sub> injectés dans les cultures correspondent aux valeurs de gaz en entrée de réacteur et ne reflètent pas le taux de CO<sub>2</sub> réellement dissout dans le milieu de culture. La quantité de CO<sub>2</sub> dissout peut être calculée en tenant compte du coefficient de transfert de masse gaz-liquide (kLa) et de la dissociation du CO<sub>2</sub> en phase aqueuse dans les conditions de culture sélectionnées (Ndiaye *et al.*, 2018). De plus, la valeur du kLa va dépendre de la géométrie du réacteur, et des systèmes d'agitation qui améliorent le transfert du CO<sub>2</sub> dans la phase liquide.

Bien que la plupart des espèces de microalgues sont photoautotrophes obligatoires, certaines espèces sont capables, en plus du CO<sub>2</sub> atmosphérique, d'utiliser des sources annexes de carbone inorganique, telles que les ions carbonate et bicarbonate. Les microalgues peuvent générer du CO<sub>2</sub> à partir de bicarbonate en excréant un proton à travers leurs membranes cellulaires, qui réagit ensuite avec l'ion HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> pour produire du CO<sub>2</sub> et de l'H<sub>2</sub>O. Certaines microalgues peuvent également absorber le HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> *via* un système de transporteur (Giordano *et al.*, 2005a). Une fois à l'intérieur de la cellule, le HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> peut être converti en CO<sub>2</sub> par les anhydrases carboniques (AC) :  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$

Ces enzymes ont été trouvées chez toutes les microalgues, qu'elles soient issues d'eau douce ou d'environnements marins (Aizawa & Miyachi, 1986). Les AC des microalgues appartiennent à la famille des β-AC. Elles ont un résidu His et deux résidus Cys qui agissent comme ligands du zinc (Bracey *et al.*, 1994 ; Rowlett *et al.*, 1994). Le mécanisme de concentration du CO<sub>2</sub> (MCC) permet de concentrer le CO<sub>2</sub> autour de la RuBisCO afin que le rapport CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> favorise la réaction de carboxylation. Le MCC est constitué i) d'un système de transport du carbone inorganique, ii) d'un compartiment séparé de la RuBisCO accumulant le CO<sub>2</sub>, iii) d'un mécanisme de libération du CO<sub>2</sub> dans le compartiment de la RuBisCO (rôle des AC) et iv) d'un mécanisme visant à empêcher le CO<sub>2</sub> de s'éloigner du site de la RuBisCO (Badger, 1987).

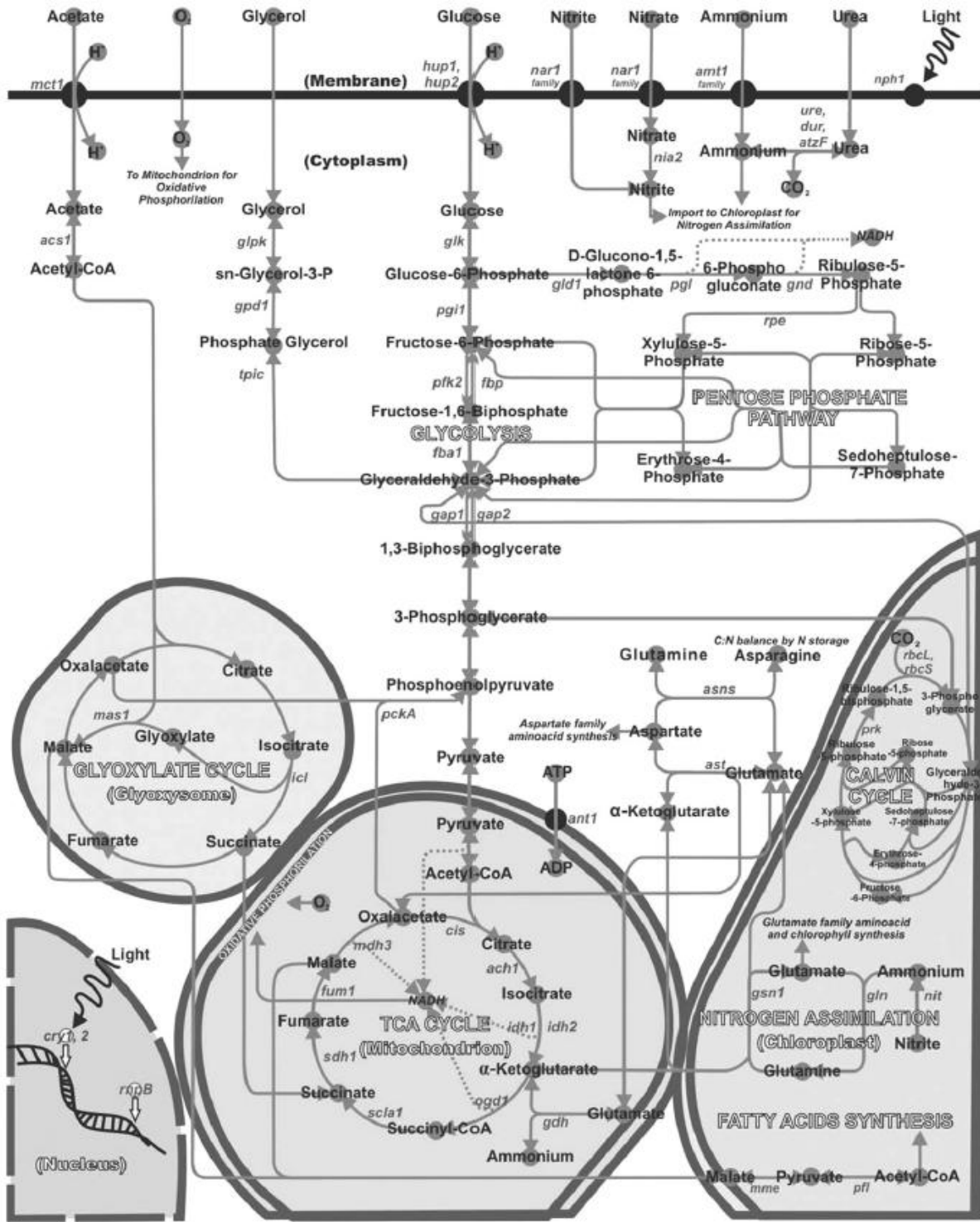
### 2.1.1.3 Le Carbone organique

Certaines microalgues et Cyanobactéries sont aussi capables, en plus du CO<sub>2</sub> atmosphérique, d'utiliser des glucides ou acides organiques simples comme le glucose, le glycérol ou l'acétate (Perez-Garcia *et al.*, 2011). Ces organismes sont dits hétérotrophes facultatifs. L'avantage principal de la culture hétérotrophe est qu'elle permet de produire de la

biomasse et des molécules d'intérêts avec un rendement beaucoup plus important par rapport à la culture en autotrophie, réduisant dans certains cas les coûts de production (Liang *et al.*, 2009). Par exemple, la quantité d'amidon floridéen chez *Galdieria sulphuraria* augmente significativement lorsqu'elle est cultivée en présence de glucose, que ce soit en mode hétérotrophe ou mixotrophe (présence concomitante d'au moins un substrat carboné organique et de lumière). De plus, son contenu lipidique, et plus particulièrement en acides gras polyinsaturés (AGPI) était plus important en condition hétérotrophe (Sakurai *et al.*, 2016). Outre une amélioration des rendements en biomasse et en molécules d'intérêts, la culture hétérotrophe n'est pas soumise aux aléas journaliers des conditions d'illumination et est moins énergivore que la culture photoautotrophe car elle ne nécessite pas l'utilisation d'une source lumineuse artificielle. Malgré cela, la culture en hétérotrophie reste très peu pratiquée en raison i) du faible nombre de souches capables d'assimiler des sources de carbone organique, ii) de la difficulté à obtenir des cultures axéniques, iii) de la nécessité d'une source lumineuse pour la biosynthèse de certains métabolites tels que les pigments et iv) du surcoût associé à l'utilisation d'une source de carbone organique (Chen, 1996). Peu de souches de microalgues ont été décrites comme capables de se développer dans des conditions hétérotrophes strictes. Cela concerne *Chlorella protothecoides*, *Galdieria sulphuraria*, *Nitzschia laevis*, *Cryptothecodinium cohnii*, *Porphyridium purpurem* et *Neochloris oleoabundans* (Xu *et al.*, 2006 ; de Swaaf *et al.*, 2001 ; Graverholt & Eriksen, 2007 ; Morales-Sánchez *et al.*, 2013 ; Wen & Chen, 2001 ; Oh *et al.*, 2009 ; Fukuda *et al.*, 2018). Dans la plupart des études, les cultures (principalement des microalgues vertes) sont réalisées en mixotrophie (Poddar *et al.*, 2018 ; Cecchin *et al.*, 2018). En mixotrophie, les microalgues et Cyanobactéries sont plus flexibles car elles peuvent capter le carbone provenant des sources organiques et inorganiques. Dans ces conditions, la lumière n'est pas une exigence stricte pour la croissance des microorganismes (Perez-Garcia & Bashan, 2015 ; Wang *et al.*, 2014).

Le choix de la source de carbone organique lors des cultures en hétérotrophie et mixotrophie est important car il induit des changements de métabolisme qui peuvent impacter la production cellulaire mais aussi la synthèse des molécules d'intérêts (Cheirsilp & Cheirsilp, 2012 ; Cer n arc a *et al.*, 2005 ; Choi & Lee, 2015 ; Heredia-Arroyo *et al.*, 2011 ; Silva *et al.*, 2016). Plusieurs sources de carbone peuvent être employées comme le glucose (Bouarab *et al.*, 2004 ; Liang *et al.*, 2009), le glycérol (Cabanelas *et al.*, 2013 ; Choi & Yu, 2015 ; Katiyar

*et al.*, 2017), l'acétate (Degrenne *et al.*, 2010 ; Liang *et al.*, 2009) et des coproduits industriels (Fábregas *et al.*, 1999a ; Cheng *et al.*, 2009 ; Mitra *et al.*, 2012). Cependant le glucose reste la source privilégiée car la plus facilement et rapidement assimilable par le plus grand nombre de microalgues et Cyanobactéries (Chen & Zhang, 1997 ; Mandal & Mallick, 2009). La revue de Gagnard *et al.* (2019) présente les différentes voies métaboliques mises en jeu dans la consommation des molécules de carbone organique chez les microalgues rouges en y incluant les systèmes membranaires permettant de capter ses ressources. Les différentes voies métaboliques pour l'assimilation du glucose, glycérol, acétate, mais aussi celles pour l'assimilation des sources d'azote (nitrate, ammonium, nitrite et urée) en condition hétérotrophe sont présentées dans la **Figure 15**.



**Figure 15 :** Métabolisme hétérotrophe chez les microalgues. Les enzymes sont indiquées sous la forme d'une « nomenclature génétique ». Seules les voies métaboliques importantes pour la croissance hétérotrophe sont présentées (Perez-Garcia *et al.*, 2011).



### 2.1.2 L'Azote

Tout comme le carbone, l'azote (N) est une ressource indispensable pour la croissance des microorganismes photosynthétiques. Il représente entre 1 et 10 % de la biomasse sèche. Les microalgues assimilent ce composé dans le but de synthétiser des acides aminés et donc des protéines mais également des acides nucléiques et d'autres composés azotés non protéiques tels que les chlorophylles (moins de 5 % de l'azote organique total) (**Bougaran et al., 2010 ; Lourenço et al., 2004**). Lorsque les cultures sont réalisées en photoautotrophie, les sources d'azote sont minérales ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$  et  $\text{NO}_3^-$ ). Néanmoins il existe d'autres sources d'azote pouvant être utilisées par un nombre restreint d'espèces pour leur croissance telles que l'urée ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ), divers acides aminés et le monoxyde d'azote (NO).

Les microalgues réagissent différemment en fonction de la source d'azote qu'elles ont à disposition. De manière générale une augmentation de la concentration en azote dans le milieu de culture entraîne une plus grande production de biomasse. Cela a été prouvé chez de nombreuses espèces telles que *Chlorella vulgaris* (**Bhola et al., 2011**), *Chlorella ellipsoidea* (**Yang et al., 2011**), *Porphyridium marinum* (**Soanen et al., 2016**) et *Rhodella violacea* (**Villay et al., 2013**). Cette augmentation de croissance est souche dépendante, et varie en fonction de la source d'azote employée.

A concentrations égales, la souche *Scenedesmus dimorphus* présente des taux de croissance spécifiques similaires après 21 jours de culture lorsqu'elle est cultivée en présence de  $\text{NaNO}_3$  et de  $\text{NH}_4\text{OOCCH}_3$  ( $0,068 \text{ j}^{-1}$ ) et plus faible avec de l'urée ( $0,056 \text{ j}^{-1}$ ) (**Vidyashankar et al., 2013**). La croissance de *Gyrodinium impudicum* est plus importante lorsqu'elle est cultivée en présence d'ammonium, plutôt qu'en présence de nitrates (**Yim et al., 2003**). Par ailleurs, les auteurs ont observé qu'une concentration de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  supérieure à 0,075 mM entraînait une inhibition de la croissance cellulaire. Selon **Xin et al. (2010a)**, les ions  $\text{NH}_4^+$  sont la source d'azote procurant la meilleure croissance chez *Scenedesmus* sp. (LX1), suivi par l'urée puis les nitrates (1, 0,5 et 1 mM, respectivement). A des concentrations plus élevées (5 mM), **Arumugam et al. (2013)** ont montré qu'il n'y avait pas de différence significative de production en biomasse chez *Scenedesmus bijugatus* entre les sources d'azote  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{CaNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  et l'urée. En revanche, la production de biomasse était plus élevée lorsque la microalgue était cultivée en présence d'urée (10 mM), par rapport au  $\text{CaNO}_3$  et  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (10 mM) (**Arumugam et al., 2013**).

De plus, la production de biomasse avec l'urée était plus importante à 10 qu'à 5 mM. Des résultats similaires ont été observés avec *Neochloris oleoabundans*, qui présente de meilleures productions de biomasse lorsqu'elle est cultivée en présence de 5 mM de nitrates, suivie par l'urée puis l'ammonium (Li *et al.*, 2008). Wu *et al.* (2013) ont confirmé *via* la culture de *Monoraphidium* sp. qu'une microalgue cultivée dans un milieu contenant des nitrates et de l'ammonium va d'abord privilégier l'ammonium, puis consommer les nitrates.

Le mode de culture impacte également la consommation de la source d'azote, et donc le rendement en biomasse. En effet, Perez-Garcia *et al.* (2010) ont mis en évidence que *Chlorella vulgaris* avait consommé davantage d'ammonium après 3 jours de culture lorsqu'elle était cultivée en hétérotrophie ou mixotrophie en présence de glucose (40 et 30 %, respectivement) plutôt qu'en autotrophie (~15 %), pour des taux spécifiques de croissance de 0,91, 0,61 et 0,80, respectivement. De plus, les meilleures productions de biomasse étaient obtenues en conditions autotrophique et hétérotrophique ( $\sim 10 \times 10^6$  cellules.mL<sup>-1</sup>) (Perez-Garcia *et al.*, 2010).

En plus de son impact sur la croissance cellulaire, la concentration en azote est également importante pour la synthèse de composés à forte valeur ajoutée tels que les lipides, les PS et les pigments. En effet, lorsque la totalité de la source d'azote a été consommée la croissance des microalgues et Cyanobactéries diminue car elles ne peuvent plus synthétiser les protéines et les pigments nécessaires à leur bon développement. Cela va entraîner un arrêt de la croissance cellulaire et donc une entrée en phase stationnaire. Selon plusieurs études, la carence en azote va induire soit une accumulation des lipides intracellulaires, soit une augmentation de la teneur en glucides intra- et extracellulaires (Dragone *et al.*, 2011 ; da Silva *et al.*, 2009 ; Rodolfi *et al.*, 2009 ; Ho *et al.*, 2012 ; Lv *et al.*, 2010 ; Yao *et al.*, 2012). Ainsi, *Isochrysis galbana* redirige majoritairement l'azote (urée) vers la production de protéines lors de la phase exponentielle de croissance, puis réoriente son métabolisme vers la synthèse d'acides eicosapentaénoïque (EPA, 20:5) et docosahexaénoïque (DHA, 22:6) au cours de la phase stationnaire. Ainsi, l'EPA et le DHA représentent 27,66 et 14,13 % de la quantité totale de lipides intracellulaires, respectivement en phase stationnaire et 12,76 et 5,14 %, respectivement en phase exponentielle (Fidalgo *et al.*, 1998). La quantité de pigments intracellulaires peut également être influencée par l'azote. Chez la très grande majorité des microalgues et Cyanobactéries, une carence en azote conduit à une consommation des pigments, et notamment des pigments surnuméraires qui

peuvent être alors considérés comme une réserve azotée. Ce phénomène entraîne généralement un changement de couleur de la culture chez les microalgues rouges. En effet, *Galdieria sulphuraria* en situation de carence azotée consomme d'abord ses phycobiliprotéines, puis ses chlorophylles et ses caroténoïdes. Ces modifications sont accompagnées par une réduction de la taille des chloroplastes, une membrane cellulaire qui devient plus fine et une accumulation de composés carbonés de réserve (Sinetova *et al.*, 2006). Il en est de même chez *Porphyridium cruentum* qui voit sa teneur en chlorophylle diminuer de 38,9 % après 20 jours de carence en azote (Zhao *et al.*, 2017). Par ailleurs, certaines souches sont capables de complètement modifier leur composition pigmentaire lorsqu'elles rentrent en phase stationnaire. C'est le cas de *Dunaliella salina* (souche produite à des fins commerciales) qui voit, lors de ce changement de phase de croissance, sa concentration en  $\beta$ -carotène passer de 1,28 à 14,4 g.L<sup>-1</sup>, entraînant un changement de couleur de la culture du vert au orange/rouge (Lamers *et al.*, 2012).

### 2.1.3 Le Phosphore

Le phosphore (P) représente le troisième composé inorganique le plus important pour la production de biomasse par les microalgues. En photoautotrophie, les microalgues couvrent leurs besoins en phosphore en consommant principalement des ions orthophosphates (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>). Ce dernier intervient dans la synthèse des acides nucléiques, des phospholipides (constituants des membranes cellulaires) et joue un rôle important dans le métabolisme énergétique qui permet de synthétiser l'ATP et le NADPH (Moseley *et al.*, 2006 ; Geider & Roche, 2002). Les microalgues sont capables d'accumuler le phosphore sous forme de polyphosphates (Powell *et al.*, 2009 ; Chu *et al.*, 2013). Tout comme le carbone et l'azote, ce composé est nécessaire à une croissance optimale des microalgues (Chen *et al.*, 2011). Une concentration optimale de phosphore lors de la culture entraîne une meilleure production de protéines, de PS, de chlorophylles et une meilleure activité des AC (Sun & Wang, 2009). A l'inverse, une limitation en phosphore va avoir un impact sur le rendement en biomasse (Hernandez *et al.*, 2006 ; Chia *et al.*, 2013), notamment du fait d'une diminution de l'activité photosynthétique du PSII de près de 50 % (Wykoff *et al.*, 1998). A titre d'exemple, la croissance de *Chlorella vulgaris* diminue de 43 % lorsque le milieu est carencé en phosphore (Kozłowska-Szerenos *et al.*, 2000). Des résultats similaires ont été observés chez *Scenedesmus obliquus* avec une diminution du rendement en biomasse d'un facteur 2 dans des milieux carencés en phosphore (Martínez Sancho *et al.*, 1997).

A contrario, **Wu et al. (2012)** ont montré la possibilité de produire davantage de biomasse avec moins de phosphore chez *Scenedesmus* sp. lorsqu'elle était cultivée en limitation en phosphore pendant 25 jours. Le rendement en biomasse était grandement amélioré, passant de 40 g de biomasse/g de P (en régime de non limitation en phosphore) à environ 160 g de biomasse/g de P (en régime de limitation en phosphore). Tout comme la carence en azote, celle en phosphore induit une accumulation de lipides intracellulaires chez bon nombre de microalgues telles que *Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas reinhardtii* et *Scenedesmus* (**Liang et al., 2013 ; Xin et al., 2010b ; Yang et al., 2018**). La souche *Scenedesmus obliquus* voit son contenu en lipides augmenté de 30 % lorsqu'elle est cultivée en condition de carence en phosphore (**Mandal & Mallick, 2009**). Le même type de carence induit une accumulation des triacylglycérides (TAG) chez *Chlamydomonas reinhardtii* (**Sato et al., 2014**).

#### 2.1.4 Le Soufre

Le soufre (S) est également un élément important pour le développement des organismes photosynthétiques qui l'utilisent principalement sous forme de sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) (**Giordano et al., 2005b**). Le soufre est présent dans de nombreux composés structurels et fonctionnels essentiels, tels que les acides aminés soufrés (cystéine et méthionine), le glutathion, les sulfolipides, la biotine (vitamine B8) et le coenzyme A (**Giordano & Prioretti, 2016**). Une carence en soufre entraîne une diminution des taux de croissance chez *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana* et *Parachlorella kessleri*. Cela se traduit par de fortes différences de concentrations cellulaires, qui sont 5, 3,2 et 2,5 fois plus faibles en condition de carence en soufre pour *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana* et *Parachlorella kessleri*, respectivement (**Mizuno et al., 2013**). En revanche, aucune différence significative n'est observée pour *Chlorella lobophora*. De plus, les teneurs en amidon des différentes microalgues sont plus importantes lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu déficient en soufre. *Parachlorella kessleri* montre l'augmentation de la teneur en amidon la plus importante (21 % en milieu TAP avec S et 51 % en milieu TAP déficient en S) (**Mizuno et al., 2013**). Chez *Tetraselmis subcordiformis*, la culture en absence de soufre et à  $200 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  entraîne une diminution de la croissance cellulaire et une augmentation de la productivité en amidon d'un facteur 2,2 (**Yao et al., 2018**). Des concentrations en soufre trop faibles dans le milieu vont également avoir des répercussions sur l'appareil photosynthétique. A titre d'exemple elles peuvent diminuer le flux d'électrons chez

*Chlamydomonas reinhardtii* (Rochaix, 2001). Par ailleurs, la carence en soufre induit la production d'H<sub>2</sub> en présence de lumière via la voie de l'hydrogénase réversible suite à une inhibition du PSII chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Melis et al., 2000).

### 2.1.5 Micronutriments et Vitamines

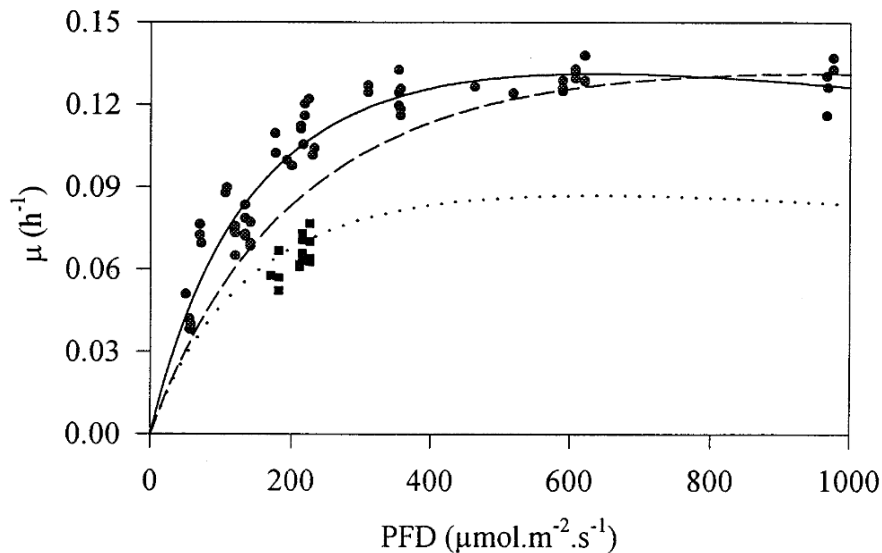
Les micronutriments et vitamines sont des éléments des milieux de culture présents en très faibles quantités. Ils ne provoquent que très rarement une carence chez les microalgues lorsqu'elles sont cultivées en conditions de laboratoire. Ils sont malgré tout obligatoires pour le bon fonctionnement de leur métabolisme. Chez *Chlorella sorokiniana*, l'ajout de fer dans la culture entraîne une meilleure croissance cellulaire, ainsi qu'une augmentation du contenu lipidique, ce dernier passant de 12 à 33 % (Wan et al., 2014). Il en est de même chez *Gyrodinium impudicum* dont le rendement en biomasse est presque doublé lorsque la culture est supplémentée en ions ferriques (Yim et al., 2003). L'ajout du fer dans la culture a également des effets sur l'accumulation de lipides intracellulaires chez *Isochrysis galbana* (Liu & Wang, 2014). La nature de la source de fer est importante et impacte le métabolisme cellulaire. Chez *Dunaliella tertiolecta*, la présence de sulfate d'ammonium et de fer dans le milieu de culture entraîne un meilleur rendement en biomasse ainsi qu'une meilleure production de PS de réserve, tandis que l'EDTA ferrique induit une plus forte accumulation de lipides intracellulaires (Rizwan et al., 2017). De même, un milieu enrichi en magnésium permet d'améliorer la concentration cellulaire de *Chlorella vulgaris* (Mandalam & Palsson, 1998). La cyanocobalamine (vitamine B12) a aussi un effet positif sur la croissance de *Gyrodinium impudicum* (Yim et al., 2003).

A l'inverse, des carences en ces différents microéléments vont se traduire par différents symptômes à l'échelle cellulaire. Ainsi, un manque de zinc induit une diminution de la densité cellulaire, mais aussi une diminution de la taille des cellules, et de la quantité de chlorophylles, protéines et PS de réserves chez les diatomées *Skeletonema costatum* et *Thalassiosira oceanica* (Varela et al., 2011). La baisse des apports en fer au sein du milieu entraîne une diminution des constituants de l'appareil photosynthétique en raison de la présence de nombreux cofacteurs associés à cet élément ainsi qu'une augmentation du taux de protéines liées au processus respiratoire (Terauchi et al., 2010). De même, une concentration en cuivre trop faible dans le milieu de culture de *Chlamydomonas reinhardtii* diminue le flux d'électrons au sein de son appareil photosynthétique (Rochaix, 2001).

## 2.2 Effet des paramètres environnementaux

### 2.2.1 La lumière

Comme indiqué précédemment, la photosynthèse est dépendante de la lumière, les cellules ayant un métabolisme respiratoire à l'obscurité. L'orientation métabolique (photosynthèse vs respiration) est dépendante de la densité de flux de photons sélectionnée (DFP). Lors de la photosynthèse, le MCC ainsi que la production de NADPH, H<sup>+</sup> et d'ATP sont intimement liés à la quantité de photons perçus par la cellule (Badger & Andrews, 1982 ; Kaplan *et al.*, 1987a). En effet, la diminution du DFP entraîne la répression du MCC et la baisse de la capacité de transport du CO<sub>2</sub> chez *Anabaena variabilis* et *Chlamydomonas reinhardtii* (Ogawa & Ogren, 1985 ; Spalding *et al.*, 1984). Pour optimiser l'utilisation des photons, il est nécessaire d'étudier l'influence de l'intensité lumineuse sur le processus de photosynthèse. Pour cela il faut déterminer les taux de croissance en fonction du DFP. Cette densité de flux de photons est exprimée en  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (Zemke, 2010). Une étude a été réalisée chez *Chlamydomonas reinhardtii* et permet de diviser la courbe de croissance en 3 parties (Figure 16).

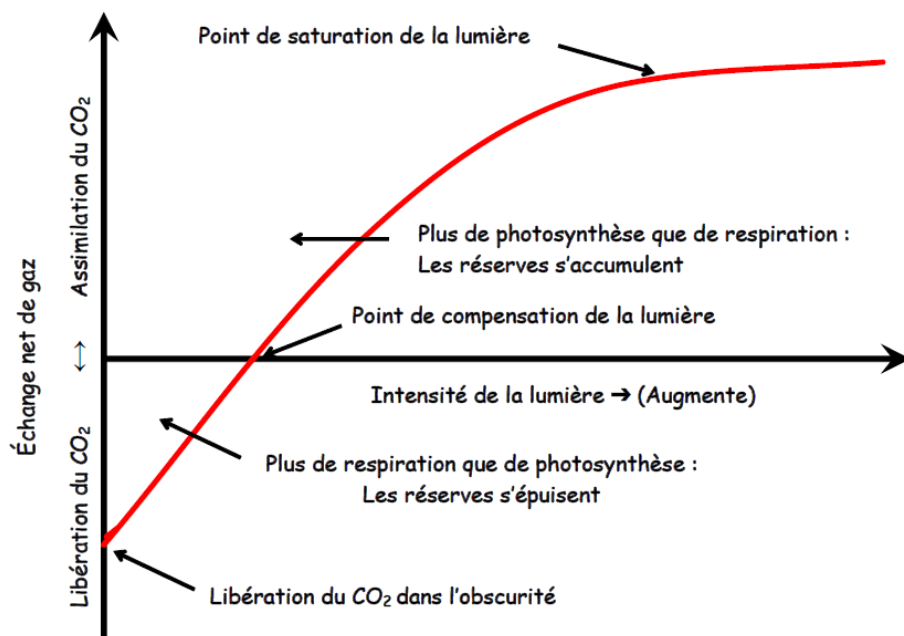


**Figure 16** : Taux de croissance spécifique ( $\mu$ ) de *Chlamydomonas reinhardtii* en fonction de la densité de flux de photons (DFP). (●) (—) Ajustement du modèle Aiba,  $\mu = f(\text{DFP})$ . (●) (--) Intégration totale de la lumière pour un cycle jour/nuit avec une fraction de lumière ( $\epsilon$ ) de 0,66 :  $\mu = f(\text{DFP}) \times \epsilon$ . (●) (···) Absence d'effets d'intégration de la lumière :  $\mu = \epsilon \times f(\text{DFP})$ . (■) Taux de croissance mesurés durant ce cycle (Janssen *et al.*, 2000).

La première partie montre une relation linéaire entre le flux incident de photons et le taux de croissance, prouvant que la lumière est un facteur limitant à la croissance. La seconde correspond à l'apparition d'un plateau. Ces intensités lumineuses plus élevées occasionnent une saturation du processus de photosynthèse, correspondant à une intensité lumineuse optimale. Enfin la troisième correspond aux intensités lumineuses plus élevées qui entraînent une diminution de l'activité photosynthétique et donc une baisse de la croissance. Cette troisième phase est atteinte à partir d'un certain seuil d'irradiance, noté  $G_s$ . Au-delà les cellules ne se multiplient plus, on entre dans une phase de photoinhibition (**Ritz et al., 2000 ; Evans et al., 1974**).

Cette valeur seuil est spécifique à chaque espèce de microalgue. A titre d'exemple, *Prymnesium parvum* ne voit pas sa vitesse spécifique de croissance augmenter lorsque l'intensité lumineuse passe de 122 à 336  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (**Baker et al., 2007**). A contrario la photoinhibition de *Pseudochlorococcum* sp. débute à des irradiances supérieures à 300  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . *Scenedesmus obliquus* entre en phase de limitation à des intensités lumineuses inférieures à 180  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . La plus forte croissance est obtenue pour des intensités comprises entre 180 et 540  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (phase de saturation avec un  $G_s$  à 420  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Au-delà il y a une inhibition de la croissance (**Ho et al., 2012**).

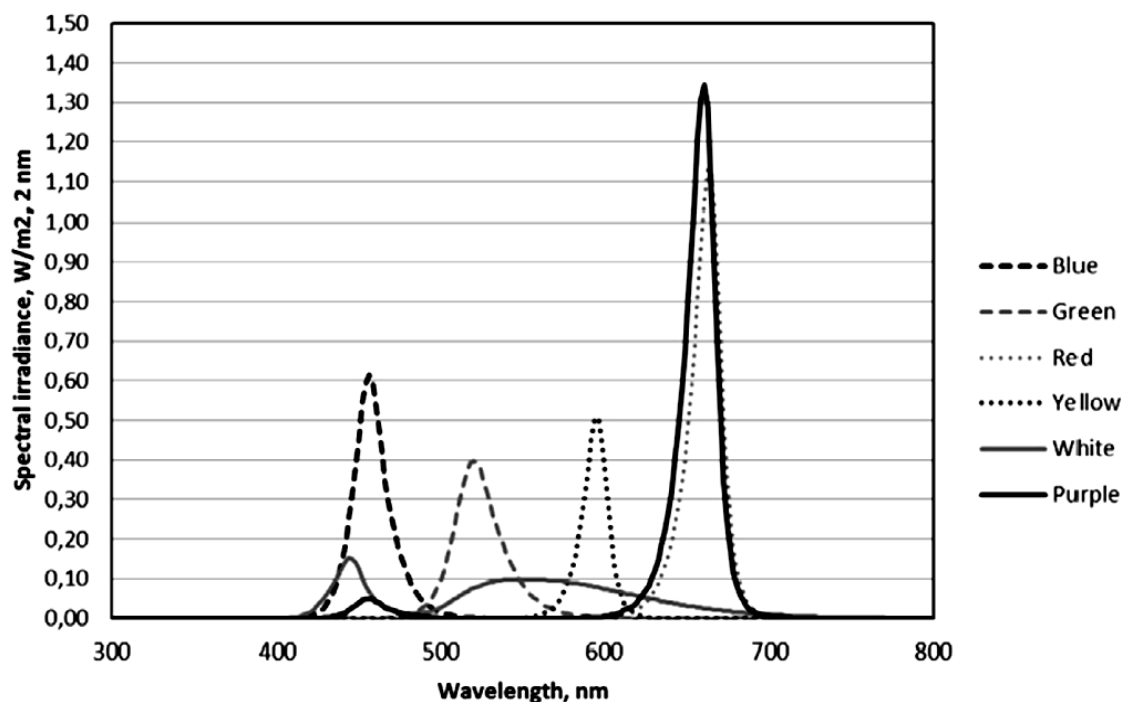
Ainsi, la réponse des microalgues et Cyanobactéries vis-à-vis de la lumière peut être défini en 4 points : i) le point de compensation ( $G_c$ ) où la photosynthèse compense à l'équilibre la respiration, ii) une phase de limitation où la quantité de lumière n'est pas assez importante pour permettre une photosynthèse optimale ( $G < G_s$ ), conduisant à un taux de croissance spécifique non optimal, iii) une phase de saturation où la photosynthèse est maximale ( $G_s$ ) et iv) une phase d'inhibition où la lumière est trop forte et entraîne une photoinhibition ( $G > G_s$ ) (non visible sur la figure présentée) (**Figure 17**).



**Figure 17 :** Processus de photosynthèse et de respiration chez les végétaux en fonction de l'intensité de lumière (Tousignant & Delorme, 2006).

Dans le cadre des cultures en batch en photobioréacteur (PBR) ou raceway, l'augmentation de la biomasse au cours du temps va atténuer de plus en plus la diffusion de la lumière dans la culture. L'efficacité d'un PBR à produire de la biomasse algale est gouvernée en partie par la quantité de lumière qui pénètre dans la culture (Cornet, 2010). Une densité cellulaire importante empêche la lumière d'atteindre la totalité des cellules et augmente les phénomènes de photo-ombrage, alors qu'une faible densité de cellules augmente les risques de photoinhibition (Cornet, 2010). L'une des manières d'améliorer cette pénétration est de créer une agitation permettant de limiter le phénomène de zones sombres afin de rendre le flux de photons accessible à toutes les cellules (Graziella *et al.*, 2013 ; Zemke, 2010). Une autre manière de limiter ce phénomène est d'ajuster la concentration cellulaire au sein du réacteur, par soutirages réguliers afin de maintenir une concentration cellulaire stable. Enfin, il est possible d'améliorer le transfert de la lumière dans un PBR en diminuant le trajet parcouru par celle-ci et en augmentant le rapport surface/volume (Jacop-Lopes *et al.*, 2009 ; Cornet, 2010 ; Zijffers *et al.*, 2010). Il est également possible d'accroître le rendement en biomasse en sélectionnant les longueurs d'ondes spécifiques du contenu pigmentaire de la microalgue *via* des LED de couleurs (Figure 18).





**Figure 18** : Spectres d'irradiance des différentes sources de lumière (Hultberg *et al.*, 2014).

En effet, le rayonnement photosynthétiquement actif (RPA) correspond à la partie de la lumière solaire (lumière blanche) qui peut être utilisée par les microalgues et Cyanobactéries pour la photosynthèse (plage de longueurs d'ondes de 400 à 700 nm). L'énergie lumineuse est captée par les pigments, qui absorbent les photons et transportent l'énergie lumineuse. Les types et les concentrations des pigments présents définissent les plages de longueurs d'ondes du RPA qui vont pouvoir être utilisées par le microorganisme. Chaque organisme va donc avoir une affinité différente vis à vis de la lumière blanche. Il est cependant possible, notamment avec des cultures sous lumière artificielle de sélectionner la source lumineuse en adéquation avec le contenu pigmentaire de l'espèce cultivée. Par exemple, la quantité de biomasse produite avec *Chlorella vulgaris* est maximale lorsqu'elle est cultivée sous lumière jaune (Hultberg *et al.*, 2014). La lumière étant captée par les pigments photosynthétiques, leurs compositions quantitatives et qualitatives vont varier en fonction de l'intensité du flux de photons incident. Chez les Cyanobactéries un flux de photons trop important entraîne une diminution de la teneur en phycobiliprotéines dans les cellules (Jahn *et al.*, 1984 ; Marquardt & Rehm, 1995 ; Akimoto *et al.*, 2012). La photoinhibition induit également une accumulation de lipides et de PS de réserve (Li *et al.*, 2011a). L'irradiance a également des effets sur l'assimilation des nitrates. Ainsi, une

augmentation de l'irradiance permet d'augmenter la vitesse d'assimilation de composés azotés inorganiques mais n'a aucun effet sur l'assimilation de l'azote organique (**Perez-Garcia et al., 2011**). Le cycle d'éclairage va lui aussi impacter la croissance mais également l'accumulation de lipides intracellulaires. **Reboloso Fuentes et al. (2000)** ont montré que plus la phase d'éclairage lors d'un cycle lumière/obscurité était longue (au minimum 12 h/12 h et au mieux 18 h/6 h) et plus les productivités en biomasse et en lipides étaient importantes. C'est par exemple le cas de *Nannochloropsis* sp. dont la croissance et la production de lipides sont optimales avec un cycle lumière/obscurité de 18 h/6 h et sous une irradiance de  $100 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (**Wahidin et al., 2013**). De plus, chez cette microalgue le cycle va être d'autant plus important lorsqu'elle est cultivée à des irradiances faibles ( $50 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) ou fortes ( $200 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) puisqu'il va impacter davantage les rendements en biomasse. Ce qui n'est pas le cas pour un éclairage optimal de  $100 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  qui procure un taux de croissance équivalent, quel que soit le cycle (24 h/0 h et 18 h/6 h) (**Wahidin et al., 2013**).

### 2.2.2 La température

Les microalgues n'ont pas toutes le même comportement vis à vis de la température. La réponse des cellules à différentes températures est variable selon les espèces (**Zucchi & Necchi, 2001**). Ainsi elles peuvent être cryophiles (e.g. *Navicula glaciei* et *Navicula perminuta*), mésophiles ou encore thermophiles (e.g. *Galdieria sulphuraria* et *Cyanidium caldarium*) (**Kang et al., 1999 ; Schmidt et al., 2005 ; Doemel & Brock, 1971**). Dans la majorité des cas, la température de développement optimum des microalgues se trouve entre 20 et 35 °C (e.g. *Porphyridium*, *Phaeodactylum*, *Chlorella*, *Scenedesmus*...). A titre d'exemple le taux spécifique de croissance de *Nannochloropsis oculata* est maximal à 20 °C et est divisé par 2 lorsque la souche est cultivée à 15 et 30 °C (**Converti et al., 2009**). A l'inverse la croissance de *Chlorella vulgaris* n'est pas affectée à 25, 30 et 35 °C. En revanche celle-ci devient nulle à 38 °C (**Converti et al., 2009**). Un résultat similaire est retrouvé avec *Scenedesmus almeriensis* qui possède une croissance optimale à 30 °C puis fortement atténuée pour des températures plus importantes (**Sánchez et al., 2008**). La température n'affecte pas seulement la croissance, mais aussi le contenu cellulaire. Chez *Scenedesmus almeriensis*, la productivité en lutéine augmente avec l'augmentation de la température (**Sánchez et al., 2008**). De même, la quantité d'AGPI accumulée par *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris* et *Botryococcus braunii* est impactée par la

température utilisée pour cultiver cette souche (**Sushchik et al., 2003**). **Jiang & Gao (2004)** ont montré que la production d'EPA et d'AGPI ( $\text{mg.g}^{-1}$  de masse sèche) par *Phaeodactylum tricornutum* augmentait de 50 et 20 %, respectivement, lorsque la température passe de 25 à 20 °C après 6 jours de culture, respectivement. La température impacte également l'assimilation du  $\text{CO}_2$  de façon indirecte car plus la température est élevée et moins le  $\text{CO}_2$  va se dissoudre dans le milieu de culture. De façon directe une hausse de la température va diminuer l'affinité de la RuBisCO pour le  $\text{CO}_2$  en élevant son seuil de saturation (**Beardall et al., 2009**). A l'inverse, une température basse entraîne une diminution de l'assimilation du  $\text{CO}_2$  par *Chlorella vulgaris* et *Dunaliella salina*, ainsi qu'une diminution de la capacité photosynthétique, de la synthèse de chlorophylle et une augmentation de la production de xanthophylles (**Huner et al., 1998**).

### 2.2.3 Le pH

Le pH d'un milieu dépend principalement de sa teneur en carbone inorganique ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{HCO}_3^-$  et  $\text{CO}_3^{2-}$ ). Les variations de ces sources de carbone inorganique sont dues à différents phénomènes : l'activité photosynthétique, l'assimilation des ions nitrate lors de la croissance, l'apport de  $\text{CO}_2$  dans la culture et le  $\text{CO}_2$  produit lors de la respiration (**Becker, 1994**). En effet, le pH va augmenter lors de la photosynthèse *via* la consommation du  $\text{CO}_2$  et la production d' $\text{O}_2$  (**García et al., 2006**) mais également lors de la consommation des nitrates qui vont libérer des ions  $\text{OH}^-$  (**Markou et al., 2014**). A l'inverse la consommation d'ions  $\text{NH}_4^+$  va entraîner une diminution du pH *via* la libération d'ions  $\text{H}^+$  dans le milieu. La plupart des microalgues sont alcalophiles, c'est-à-dire qu'elles se développent correctement dans des milieux où le pH est compris entre 7 et 10. Comme pour la température, il existe un pH optimal pour la croissance de chaque microalgue. Par exemple, l'espèce *Scenedesmus almeriensis* est capable de croître à des pH compris entre 7 et 10 mais trouve son optimum de croissance pour un pH de 8 (**Sánchez et al., 2008**). *Chlorella vulgaris*, *Chlorella ellipsoidea* et *Dunaliella bardawil* sont également capables de se développer sur une plage de pH très large, allant de 3 à 11, avec un optimum à 6,5, 10 et 7, respectivement (**Mayo, 1997 ; Khalil et al., 2010**). De même *Chlamydomonas acidophila* et *Scenedesmus* sp. (LX1) se développent respectivement à des pH compris entre 2 et 9, et 4 et 10, avec un optimal de croissance à pH 6 pour *Chlamydomonas acidophila* et 10 pour *Scenedesmus* sp. (LX1) (**Cuaresma et al., 2006 ; Xin et al., 2010a**). *Isochrysis galbana* a également un pH optimal de 5,7 (**Kaplan et al., 1986**). Un pH trop élevé

(au-delà de 9) va avoir un effet néfaste sur la croissance des microalgues car il provoque la précipitation de certains sels de calcium (Becker, 1994 ; Sirisansaneeyakul *et al.*, 2011). Il est donc important de réguler le pH lors des cultures pour obtenir des rendements en biomasse optimaux.

#### 2.2.4 Les conditions salines

Chaque microalgue possède une salinité favorisant sa croissance et correspondant souvent à la salinité de son habitat naturel. Un changement de salinité peut avoir un effet sur la productivité en biomasse. Ainsi, la meilleure productivité en EPS de la microalgue halophile *Dunaliella salina* est obtenue pour une concentration en sels de 5 M (Mishra & Jha, 2009). De plus, un stress osmotique (0,34 M de NaCl ou KCl) entraîne une augmentation de la production de lipides intracellulaires (80 et 66 %, respectivement) chez la microalgue verte d'eau douce UTEX 2219-4 qui est étroitement apparentée à la famille des Scenedesmaceae (Wang *et al.*, 2011).

#### 2.2.5 Le cisaillement

L'agitation lors de la culture des microalgues est indispensable pour obtenir des productivités importantes en biomasse. Elle permet d'éviter les phénomènes de sédimentation, de création de gradients de pH et de température, de mieux répartir le flux de photons, de favoriser l'apport de CO<sub>2</sub> en améliorant le transfert gaz-liquide (Eriksen, 2008). L'agitation peut être i) mécanique, à l'aide de pales telles que les turbines de Rushton ou des hélices, les roues à aube (systèmes raceway) et les pompes (PBR tubulaire), et/ou ii) réalisée *via* la diffusion de gaz au sein de la culture (système airlift). La seconde solution est quasi systématique car l'injection de gaz (air seule et/ou mélange air/CO<sub>2</sub>) dans le milieu sous forme de fines bulles permet à la fois de créer une circulation du liquide, de réguler le pH par l'apport de CO<sub>2</sub> et ainsi d'améliorer le rendement en biomasse. L'agitation nécessaire à l'homogénéisation des cultures se doit d'être importante lorsque les densités cellulaires deviennent conséquentes, afin de favoriser l'accès à la lumière au plus grand nombre de cellules (Graziella *et al.*, 2013). Néanmoins de hauts niveaux de turbulence peuvent endommager les microalgues en raison de la contrainte de cisaillement engendrée. Les dommages par cisaillement sont parfois utilisés comme argument contre l'agitation mécanique dans les cultures de microalgues. Cependant, les bulles d'air peuvent

également entraîner un cisaillement important et endommager les microalgues (**Barbosa et al., 2003 ; Vega-Estrada et al., 2005**).

## **2.3 Les modes de culture**

L'intérêt croissant des molécules à haute valeur ajoutée issues des microalgues et Cyanobactéries implique nécessairement le développement de moyens de culture adaptés à de la production en masse. Plusieurs technologies ont été développées au cours de ces dernières années pour la production à grande échelle de microalgues. Ces différents systèmes font appel aux mêmes procédures de production : i) capture de la lumière (naturelle ou artificielle), ii) agitation de la culture (mécanique, gaz ou un mélange des deux), iii) ajout d'une source de carbone (organique et/ou inorganique) et iv) procédé post culture (récolte, extraction et purification de la biomasse et des divers composés). Aujourd'hui les modes de culture sont divisés en deux grandes familles : les systèmes de culture à ciel ouvert aussi appelés « open ponds » et les systèmes fermés appelés PBR (**Borowitzka, 1999**).

### **2.3.1 Culture à ciel ouvert**

Les systèmes à ciel ouvert ont été les premiers à être développés pour la culture industrielle des microalgues et Cyanobactéries et sont toujours d'actualité en raison de leur facilité d'utilisation et des faibles coûts de production et de maintenance associés. Initialement ces bassins étaient de grands étangs peu profonds et non soumis à une agitation mécanique. Ce système est actuellement utilisé par la société Cognis Nutrition & Health en Australie pour la culture de *Dunaliella salina* et la production de  $\beta$ -carotène (**Figure 19A**). Par la suite des bassins agités ont vu le jour afin de diminuer la sédimentation et d'améliorer l'accès à la lumière. De plus cette agitation permet d'atténuer les gradients de concentration des minéraux constitutifs des milieux de culture, de température et de CO<sub>2</sub>. Ces systèmes agités sont des bassins peu profonds, soit de forme circulaire (**Figure 19B**) soit de forme allongée appelée « raceway » (**Figure 19C**).



**Figure 19** : Cultures de (A) *Dunaliella salina*, (B) *Chlorella* sp. et (C) *Spirulina platensis*.

Les premiers sont fortement utilisés à Taïwan par les sociétés Taiwan Chlorella Manufacturing et Far East Microalgae Manufacturer pour la production de *Chlorella* sp. Ces systèmes circulaires sont agités *via* un bras de la taille du rayon du bassin, mis en mouvement par un axe situé au centre de ce dernier. Seule l'illumination naturelle sert de source d'énergie aux cultures de microalgues réalisées dans ces systèmes. Les bassins du type « raceway » sont composés d'une série de canaux reliés les uns aux autres et formant une boucle. Ils mesurent généralement entre 25 et 30 cm de profondeur (Chisti, 2007) et la surface au sol excède rarement les 0,5 hectares (Chisti, 2016). L'agitation de la culture est effectuée par des pales (roue à aube). Les installations les plus courantes sont construites en polychlorure de vinyle (PVC), polyéthylène (PEt) ou polypropylène (PPp) (Chisti, 2013).

Malgré leur facilité d'utilisation à des coûts faibles ces systèmes de culture à ciel ouvert ne conviennent pas à toutes les microalgues. En effet, ces systèmes sont soumis aux variations climatiques comme le vent, la pluie et le soleil (cycle jour/nuit variable). Le cycle jour/nuit et la saisonnalité entraînent une variabilité importante des irradiances au cours de la journée (Reboloso Fuentes *et al.*, 1999). Cela peut constituer une restriction pour cultiver certaines

souches, en raison d'un DFP très élevé, pouvant conduire à une forte diminution de l'activité photosynthétique et aller jusqu'à la photoinhibition comme démontré chez *Porphyridium cruentum* (Reboloso Fuentes *et al.*, 1999).

La saisonnalité entraîne par ailleurs des variations importantes de température tout au long de l'année (Tran *et al.*, 2014). Ces changements de température peuvent occasionner des évaporations plus ou moins importantes et faire fluctuer la concentration en nutriments et la salinité du milieu. A l'inverse, la pluie peut être à l'origine de l'effet inverse. La culture est également soumise à des risques de contaminations virale, fongique et bactérienne, voire même de contaminations par des microalgues indésirables ou des prédateurs. En raison de tous ces inconvénients, seules les souches capables de se multiplier rapidement et dans des conditions très spécifiques de croissance peuvent être cultivées avec ces dispositifs. C'est le cas par exemple d'*Arthrospira platensis* qui nécessite l'utilisation d'un milieu de culture avec un pH alcalin ou encore de *Dunaliella salina* qui peut se développer dans un milieu hypersalé.

### 2.3.2 Photobioréacteurs

En 1989, Cohen & Arad ont proposé un nouveau design de système de culture. Il s'agit de cultiver les microalgues rouges dans des poches construites à partir de PET. Ce système permet d'éviter la contamination et les phénomènes d'évaporation/dilution occasionnés par le climat. Grâce à ce type de culture, les microalgues rouges *Porphyridium sp.* et *Porphyridium aerugineum* peuvent être cultivées à l'extérieur avec des rendements en biomasse plus importants que ceux obtenus en culture à ciel ouvert. En effet, la concentration cellulaire était augmentée de 300 et 60 % pour *Porphyridium sp.* et *Porphyridium aerugineum*, respectivement. De plus les quantités de PS produits par ces microalgues ont aussi été améliorées. Elles étaient 6 et 3 fois plus importantes pour les PS liés à la membrane cellulaire et ceux libérés dans le milieu, respectivement. Des systèmes raceways clos ont également vu le jour (Figure 20). Leur fonctionnement est identique au système raceway présenté précédemment mais le compartiment de culture est protégé de l'environnement extérieur. Malgré ces avancées, la culture de microalgues pour la production de composés à forte valeur ajoutée est majoritairement réalisée avec des systèmes fermés complexes qui sont appelés PBR.

Les PBR sont des bioréacteurs fermés, fabriqués en matériaux transparents à la lumière visible (verre, PEt, polyméthacrylate de méthyle (PMMA)) (Fuentes-Grünwald *et al.*, 2015 ; Sobczuk *et al.*, 2005 ; Merchuk *et al.*, 2000 ; Luo & Al-Dahhan, 2012). Ces systèmes sont dotés d'instruments permettant un contrôle et un ajustement des paramètres de culture (pH, température, CO<sub>2</sub>, agitation et lumière). La source lumineuse peut être naturelle ou artificielle. Leur conception a pour but d'améliorer de manière significative la productivité en biomasse et en molécules associées.



**Figure 20** : Production industrielle de *Porphyridium cruentum* dans un système raceway clos (AlgoSolis, GePEA, Université de Nantes, CNRS, France) (Gaignard *et al.*, 2019).

Il existe actuellement plusieurs designs de PBR industriels, qui peuvent être dissociés en trois grandes catégories :

➤ Les PBR tubulaires consistent en un ensemble de conduits transparents en verre ou PMMA, formant une boucle fermée dans laquelle la culture circule sous l'effet d'une pompe. Le CO<sub>2</sub> ainsi que les nutriments nécessaires à l'élaboration de la culture peuvent être ajoutés à tout moment sans arrêt de fonctionnement du réacteur. Ces PBR peuvent être horizontaux ou verticaux (**Figure 21A**). La position verticale est très souvent privilégiée car elle occupe moins de surface au sol et est moins sensible aux fortes intensités lumineuses (Cuaresma *et al.*, 2011).

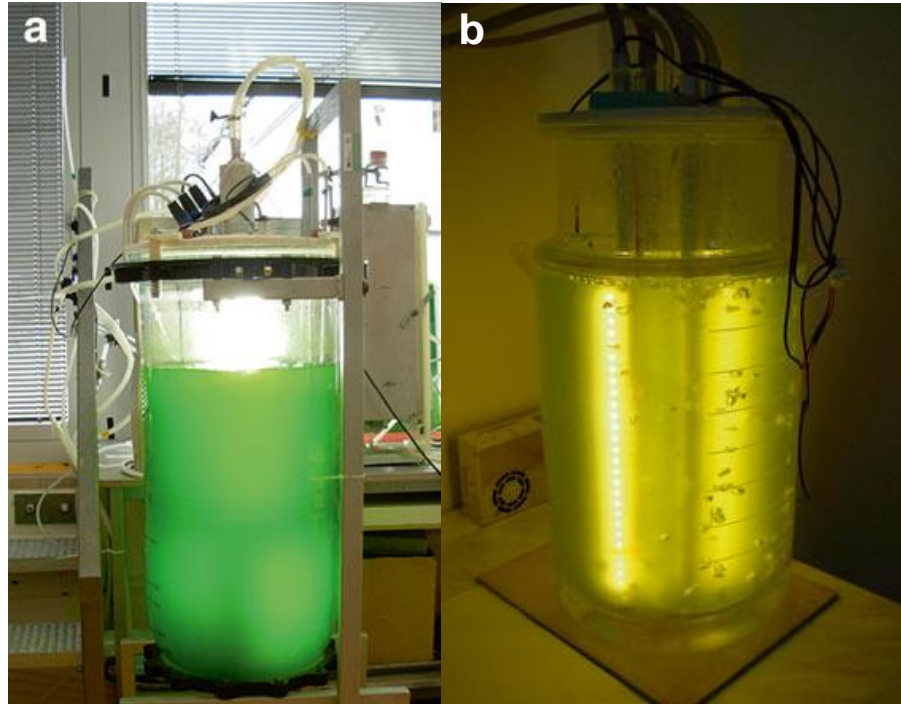




**Figure 21 :** Cultures de *Porphyridium cruentum* en (A) photobioréacteur vertical tubulaire (Copyright : Société Greensea, Mèze, France), (B) photobioréacteur plan non incliné en lumière artificielle (Copyright : Algosource Technology, France) et (C) photobioréacteur plan incliné en lumière naturelle (Copyright : Plateforme AlgoSolis, GePEA, Université de Nantes, CNRS) (Gaignard *et al.*, 2019).

➤ Les PBR plans consistent en un panneau en verre ou PMMA, le plus souvent en position verticale. A noter que des systèmes à inclinaison variable existent et permettent d’orienter et d’adapter la culture à la lumière émise par le soleil. Le CO<sub>2</sub> est introduit par le bas de la culture entraînant ainsi une agitation du milieu (Figures 21B et 21C).

➤ Les PBR annulaires s'apparentent à des fermenteurs cylindriques à l'intérieur desquels la lumière est émise (**Muller-Feuga *et al.*, 2003**) (**Figure 22**).



**Figure 22** : PBR annulaires (a) LED-PBR-100 avec un volume de culture de 90 L et (b) LED-PBR-10 avec un volume de culture de 8 L (**Sergejevová *et al.*, 2015**).

Les PBR présentent de nombreux avantages. Ils offrent un contrôle total sur la culture, ce qui permet d'adapter les différents paramètres à chaque souche. Étant des systèmes clos, le risque de contamination est très faible et l'évaporation est grandement réduite. De plus ils offrent des meilleurs transferts de lumière et de gaz. Tous ces critères participent à l'amélioration de la productivité et permettent d'orienter le métabolisme des souches cultivées pour la production de molécules d'intérêts. Cependant, des coûts de production très élevés (coûts des équipements pour la culture et coûts liés à la maintenance) sont associés à l'utilisation de ces réacteurs (**Norsker *et al.*, 2011**). Ces systèmes sont aussi très impactés par l'encrassement biologique. La revue de **Zeriouh *et al.* (2017)** résume les connaissances sur l'encrassement biologique en PBR par des microalgues et met en évidence que le mécanisme d'adhésion des cellules est similaire au mécanisme de la formation des biofilms chez les bactéries. De nouveaux systèmes sont actuellement développés afin de réduire ces coûts et d'améliorer la productivité en molécules

d'intérêts, notamment par les microalgues dites fragiles telles que les Rhodophyta (**Gaignard et al., 2019**).

### **3. Molécules d'intérêts chez les microalgues**

#### **3.1 Les lipides et acides gras polyinsaturés**

Les microalgues produisent, au niveau des chloroplastes, de la matière carbonée réduite par photosynthèse. Le G3P issu du cycle de Calvin-Benson permet à la cellule de biosynthétiser des sucres ou des lipides. Les lipides sont des constituants indispensables des microalgues. On les retrouve impliqués dans des fonctions structurales (phospholipides constitutifs des membranes) et énergétiques (molécules de réserve). Les microalgues stockent les lipides sous forme de triacylglycérols (ou triglycérides). Elles se distinguent des macroalgues par des teneurs en lipides plus importantes. Elles contiennent une grande variété d'acides gras, dont la composition varie en fonction des espèces. Certaines microalgues dites oléagineuses telles que *Pseudochlorococcum* sp. ou *Nannochloropsis oceanica* peuvent accumuler des lipides à hauteur de 52 et 65 %, respectivement (**Li et al., 2011a ; Wan et al., 2013**). Globalement, les lipides intracellulaires représentent 16 à 75 % de la masse sèche des microalgues (**Harun et al., 2010**).

A l'heure actuelle, les lipides neutres comme les triglycérides et les acides gras libres sont les plus exploités dans l'industrie alimentaire, cosmétique et pharmaceutique. Une des caractéristiques principales des lipides neutres est leur teneur en acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI). Parmi tous les acides gras présents chez les microalgues, on trouve l'acide  $\gamma$ -linoléique (GLA, 18 : 3, *cis* 6, 9, 12), l'acide arachidonique (AA, 20 : 4, *cis* 5, 8, 11, 14), l'acide eicosapentaénoïque (EPA, 20 : 5, *cis* 5, 8, 11, 14, 17) et l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22 : 6, *cis* 4, 7, 10, 13, 16, 19) (**Certik & Shimizu, 1999**). Ces acides gras sont dits « essentiels » car ils ne peuvent pas être synthétisés par les vertébrés, notamment les mammifères, et doivent être apportés par l'alimentation. L'EPA et l'AA peuvent moduler le métabolisme humain. L'AA est un composant des membranes phospholipidiques et précurseur des prostaglandines, alors que l'EPA est précurseur des eicosanoïdes (**Rebeloso Fuentes et al., 2000**). Ces acides gras essentiels sont actuellement majoritairement produits à partir des huiles de poissons qui devraient voir leurs prix évoluer fortement à la hausse dans un proche avenir du fait de leur raréfaction et d'une augmentation de la demande en pisciculture. Les microalgues présentent l'avantage de ne pas contenir de cholestérol, d'accumuler de grandes quantités d'acide gras et d'être cultivables

grâce aux PBR. Elles représentent donc une alternative intéressante face à la production d'AGPI à partir des huiles de poisson. Quelques espèces de microalgues comme *Nannochloropsis*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Porphyridium*, *Nitzschia laevis*, *Mortierelle*, *Pythiturn* et *Parietochloris incisa* ont montré un énorme potentiel de production industrielle présentant entre 7 et 50 % d'EPA dans leur huiles (Certik & Shimizu, 1999 ; Khozin-Goldberg *et al.*, 2006). Par ailleurs, l'huile extraite de *Schizochytrium*, contenant au minimum 32 % de DHA, a récemment été autorisée en tant que nouvel ingrédient alimentaire (Marfaing & Lerat, 2007). A l'heure actuelle, la richesse en lipides des microalgues et leur relative facilité de production les rendent intéressantes pour les secteurs de la nutraceutique et des biocarburants si on fait abstraction des aspects économiques liés à leur production qui constituent encore à l'heure actuelle un frein à leur développement.

Le contenu lipidique des microalgues est propice à la production de biodiesel (Harun *et al.*, 2010). Dans le cas de *Nannochloropsis oceanica*, les principaux acides gras identifiés ont été l'acide hexadecadiénoïque (C16 : 2), l'acide palmitique (C16 : 0) et l'acide oléique (C18 : 1) avec un ratio de 65 % de lipides saturés et 26-33 % de mono-insaturés. L'environnement et les conditions de cultures impactent la composition et la teneur en lipides des microalgues. Chez les espèces appartenant aux genres *Chlorella* et *Scenedesmus*, les températures supérieures à la température optimale de croissance permettent une augmentation des C16 et une diminution des C18 (Xin *et al.*, 2011 ; Han *et al.*, 2013). De plus la voie de biosynthèse des lipides peut être favorisée, notamment en cas de carence en azote, ou en silicium chez les diatomées.

### 3.2 Les protéines

Le taux de protéines chez les algues varie considérablement selon les espèces et dépend de la saisonnalité (Galland-Irmouli *et al.*, 1999). Chez les algues brunes les protéines représentent entre 3 et 15 % du poids sec, ce qui est relativement faible en comparaison avec les algues vertes et rouges qui en contiennent entre 10 et 47 % (Arasaki & Arasaki, 1983 ; Rupérez & Saura-Calixto, 2001). Ainsi, *Spirogyra* sp. accumule entre 6 et 20 % de protéines alors que le contenu protéique d'*Arthrospira maxima* représente entre 60 et 71 % de son poids sec (Becker, 2007). La production de protéines est maximale lorsque les microalgues sont en phase exponentielle de croissance (Ho *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2013) et diminue logiquement lors de carences azotées. Différents facteurs peuvent influencer leur production. Par exemple, *Chlorella*

*vulgaris* possède la meilleure productivité lorsqu'elle est cultivée à 35 °C (Mahboob *et al.*, 2012). Les protéines des microorganismes photosynthétiques peuvent constituer une source importante d'acides aminés essentiels (Ursu *et al.*, 2014 ; Mahboob *et al.*, 2012 ; Pignolet *et al.*, 2013). A titre d'exemple, la fraction protéique d'*Arthrospira platensis* peut contenir jusqu'à 60 % d'acides aminés essentiels (Dillon & Phan, 1993). Ce taux est similaire à ceux que l'on peut retrouver dans les œufs et le soja (Becker, 2007). De plus, les protéines des microalgues *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella* sp. et *Spirulina* sp., obtenues par séchage sur tambour présentent un coefficient de digestibilité égal à 88, 89 et 75,5 %, respectivement (Becker, 2007). De ce fait les algues marines sont utilisées depuis des milliers d'années comme compléments dans l'alimentation humaine et animale, notamment en pisciculture, en raison de leur haute teneur en protéines (Harun *et al.*, 2010). *Arthrospira platensis* est mondialement reconnue pour ses qualités nutritionnelles supérieures à la viande (65 % du poids sec en protéines), ce qui en fait un organisme de choix pour lutter contre la malnutrition. Malgré cela, les protéines sont souvent mises de côté lors de la valorisation des microalgues, contrairement aux AGPI ou aux pigments destinés aux industries pharmaceutique et nutraceutique. La raison principale de cette faible valorisation est économique. Par ailleurs, il n'y a toujours pas d'applications liées aux protéines issues des microalgues dans l'alimentation humaine car la présence de composants non protéiques (*e.g.* chlorophylles) entraîne des modifications indésirables de couleur et de goût (Schwenzfeier *et al.*, 2011).

### 3.3 Les pigments

Les pigments des microorganismes photosynthétiques exploités au niveau commercial sont la phycocyanine d'*Arthrospira platensis*, la phycoérythrine de *Porphyridium cruentum*, l'astaxanthine de *Haematococcus pluvialis* et le  $\beta$ -carotène de *Dunaliella salina* (Becker, 2004 ; Dufossé *et al.*, 2005). *Dunaliella salina* peut accumuler jusqu'à 14% de son poids sec en  $\beta$ -carotène (Ben-Amotz, 1993). L'accumulation de caroténoïdes est généralement considérée comme une stratégie de survie employée par les algues en situation de stress photo-oxydatif ou d'autres conditions environnementales défavorables (Hu *et al.*, 2008). Les applications des pigments sont variées. Ils sont utilisés principalement en tant que colorant naturel alimentaire, comme le E160a pour le  $\beta$ -carotène ou le Linablue® pour la phycocyanine (Pangestuti & Kim, 2011 ; Markou & Nerantzis, 2013). Le Linablue® est également utilisé dans les industries

cosmétiques (**Jahan et al., 2017**). Sur le marché actuel, l'astaxanthine est principalement extraite d'*Haematococcus pluvialis*. Ce pigment, naturellement présent chez les crustacés (crabes, crevettes, homard, écrevisses, langoustes), le saumon et la daurade rose est un antioxydant très puissant. Il peut être utilisé comme additif dans l'alimentation animale pour la coloration des saumons ou des truites. Les pigments trouvent aussi des applications dans la cosmétique (**Del Campo et al., 2000 ; Xhaufaire-Uhoda et al., 2008 ; Lima & Kimball, 2011 ; Jahan et al., 2017**). Ils sont porteurs d'activités biologiques. Par exemple la chlorophylle peut être utilisée comme agent de régénération du foie (**Harun et al., 2010**). Le  $\beta$ -carotène peut être utilisé comme précurseur de la vitamine A (rétinol), une vitamine très importante, à tout âge, notamment pour la santé des cellules et la vision (**García-González et al., 2005**). Un effet thérapeutique préventif vis-à-vis du cancer est aussi attribué à l'astaxanthine (**Guerin et al., 2003**). Ce pigment possède également des activités antioxydante, immuno-stimulatrice, anti-cholestérolémiant, anti-inflammatoire et protectrice vis-à-vis des UV (**Guerin et al., 2003**). Des études menées en laboratoire ont également mis en évidence une activité pro-apoptotique des pigments sur des cellules cancéreuses (**Gagez et al., 2012 ; Baudalet et al., 2013 ; Gantar et al., 2012 ; Kumar et al., 2013**). Le travail de **Pasquet (2011)** a également permis d'isoler la violaxanthine, un caroténoïde bioactif dont l'IC<sub>50</sub> sur les cellules tumorales mammaires (lignée MCF-7) est de 11  $\mu\text{M}$ . Des résultats similaires sont rapportés dans la littérature, dans le domaine de la santé en tant que molécule anti-obésité ou antidiabétique (**Riccioni et al., 2011 ; D'Orazio et al., 2012**). Les phycobiliprotéines sont largement utilisées en industrie pour des applications en immunologie diagnostique. En effet, les propriétés de la phycoérythrine (rouge) et de la phycocyanine (bleue) en font des réactifs fluorescents hautement sensibles et très puissants qui sont exploitées pour le diagnostic en recherche, médecine et en industrie alimentaire (**Sekar & Chandramohan, 2008 ; Pandey et al., 2013**). La B-phycoérythrine (B-PE) extraite de *Porphyridium cruentum* est utilisée comme colorant naturel dans la formulation de produits cosmétiques (**Ruiz-Ruiz et al., 2013**). De plus, la B-PE isolée de *Porphyridium marinum* possède une activité antioxydante proche de celle de l'acide L-ascorbique (vitamine C) (**Gargouch et al., 2018**). La valeur de l'IC<sub>50</sub> de la B-PE purifiée de *Porphyridium marinum* était d'environ 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , ce qui est bien meilleur que celles des phycoérythrines extraites de *Michrochaete* sp. (43  $\text{mg.mL}^{-1}$ ) (**Hemlata et al., 2018**) et de *Lyngbya* sp. (233  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (**Sonani et al., 2014**). La phycoérythrine de *Michrochaete* sp. présente également une activité anticancéreuse (IC<sub>50</sub> = 105  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), et celle de *Porphyridium marinum*

est aussi capable de chélater les ions  $\text{Fe}^{3+}$  et de prévenir l'oxydation des lipides avec une efficacité plus importante que la molécule de référence ( $\text{IC}_{50} = 11,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$  contre  $23,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$  pour le BHT) ( $\text{IC}_{50} = 14 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (Gargouch *et al.*, 2018).

### 3.4 Les polysaccharides

#### 3.4.1 Généralités

Les PS sont des molécules de très haut poids moléculaire. Ils sont composés de plusieurs oses reliés les uns aux autres par des liaisons osidiques. Ces molécules sont largement étudiées par la communauté scientifique depuis plusieurs dizaines d'années. Aujourd'hui leurs propriétés fonctionnelles, que ce soit en tant qu'agent de texture ou plus récemment en tant qu'actif biologique leurs ont permis d'être exploitées dans divers domaines industriels tels que l'agroalimentaire, la pharmacutique et la cosmétique. Les PS sont issus de sources diverses puisqu'on les retrouve chez tous les organismes vivants : animaux, plantes supérieures incluant les macroalgues, les microalgues, les champignons et les bactéries. A cette diversité d'origines est associée une grande diversité de structures, plus ou moins complexes. Outre les applications industrielles, ces molécules possèdent des rôles physiologiques importants. Ils peuvent servir de polymères de réserve mais aussi avoir un rôle dans la structure des enveloppes cellulaires. C'est le cas des celluloses et hémicelluloses qui sont des PS pariétaux des plantes supérieures, ou encore de la chitine qui forme les exosquelettes des insectes et des crustacés. Les PS peuvent aussi jouer le rôle de matrice extracellulaire, dans la formation des biofilms par les microorganismes. On parle alors de mucilage ou encore de polysaccharides liés à la paroi (BPS, Bound PolySacharrides). Parfois ce mucilage se détache de la cellule, on parle alors d'exopolysaccharides (EPS). Enfin ils peuvent jouer un rôle dans la communication cellulaire en tant que médiateur cellulaire. C'est le cas de l'héparine, une molécule de la famille des glycosaminoglycanes. Ils peuvent également être impliqués dans la formation d'hydrogels comme dans le cas de l'acide hyaluronique, un autre glycosaminoglycane responsable de l'hydratation de la peau. Les PS peuvent être dissociés en 2 catégories : les homopolysaccharides composés d'un seul et même monosaccharide, et les hétéropolysaccharides composés de plusieurs monosaccharides différents. Lorsque plusieurs monosaccharides sont présents, c'est le monosaccharide majoritaire qui donne le nom au polysaccharide. A titre d'exemple, les galactoxylanes sont des polysaccharides riches en xylose (ose majoritaire) et en galactose (ose

secondaire). Les PS peuvent être linéaires ou ramifiés, et peuvent comporter des groupements non sucres associés (pyruvate, acétate, sulfate, etc.).

### 3.4.2 Propriétés structurales et biochimiques

Les PS sont des biopolymères d'oses (ou monosaccharides) ayant pour formule générale  $[C_x(H_2O)_y]_n$ , où  $n \geq 10$ . Bien que la formule brute de ces oses soit commune  $C_x(H_2O)_y$ , ils possèdent des conformations et structures variées qui permettent de les diviser en plusieurs catégories. Tous sont porteurs de fonctions alcool (OH) sur leur chaîne carbonée, à l'exception du carbone 1 qui est porteur d'une fonction aldéhyde ( $R'-COH$ ) chez les aldoses, ou du carbone 2 qui porte une fonction cétone ( $R'=CO$ ) chez les cétooses. Ces monosaccharides portent des noms différents en fonction du nombre de carbones qui compose leur chaîne. On trouve ainsi des trioses (C3), tétooses (C4), pentoses (C5) et hexoses (C6) comme monosaccharides les plus représentés dans les biomasses. De façon plus générale les oses sont dissociés en 4 grandes familles : les oses neutres, les acides uroniques, les acides sialiques et les osamines.

Les oses neutres sont généralement les monosaccharides majoritaires dans la composition des PS. On y retrouve des pentoses comme le ribose (Rib), l'arabinose (Ara), le xylose (Xyl), et des hexoses comme le glucose (Glc), le fucose (Fuc), le mannose (Man), le rhamnose (Rha) et le galactose (Gal). Ces oses existent sous 2 formes énantiomères, une forme D et une forme L pas toujours systématiquement présentes dans le milieu naturel. Sous leur forme linéaire ces sucres simples sont peu stables. Ils vont alors avoir tendance à se cycliser afin de gagner en stabilité, soit sous forme d'un cycle à 6 atomes de carbones (cycle pyrane), soit sous forme d'un cycle à 5 atomes de carbones (cycle furane). Cette cyclisation rend le carbone 1 des aldoses et le carbone 2 des cétooses asymétrique, ce qui détermine les anoméries  $\alpha$  et  $\beta$ . Toutes ces configurations font qu'il est théoriquement possible de retrouver un hexose donné sous 8 formes différentes. A titre d'exemple, le Glc peut être présent dans les formes  $\alpha$ -D-glucofuranose ;  $\beta$ -D-glucofuranose ;  $\alpha$ -D-glucopyranose ;  $\beta$ -D-glucopyranose ;  $\alpha$ -L-glucofuranose ;  $\beta$ -L-glucofuranose ;  $\alpha$ -L-glucopyranose et  $\beta$ -L-glucopyranose. Néanmoins, chaque ose sera majoritairement présent dans l'une de ces configurations compte tenu de sa stabilité dans un environnement donné. Ainsi, le glucose des PS naturels se présente sous les formes  $\alpha$ -D- et  $\beta$ -D-glucopyranoses car ce sont les



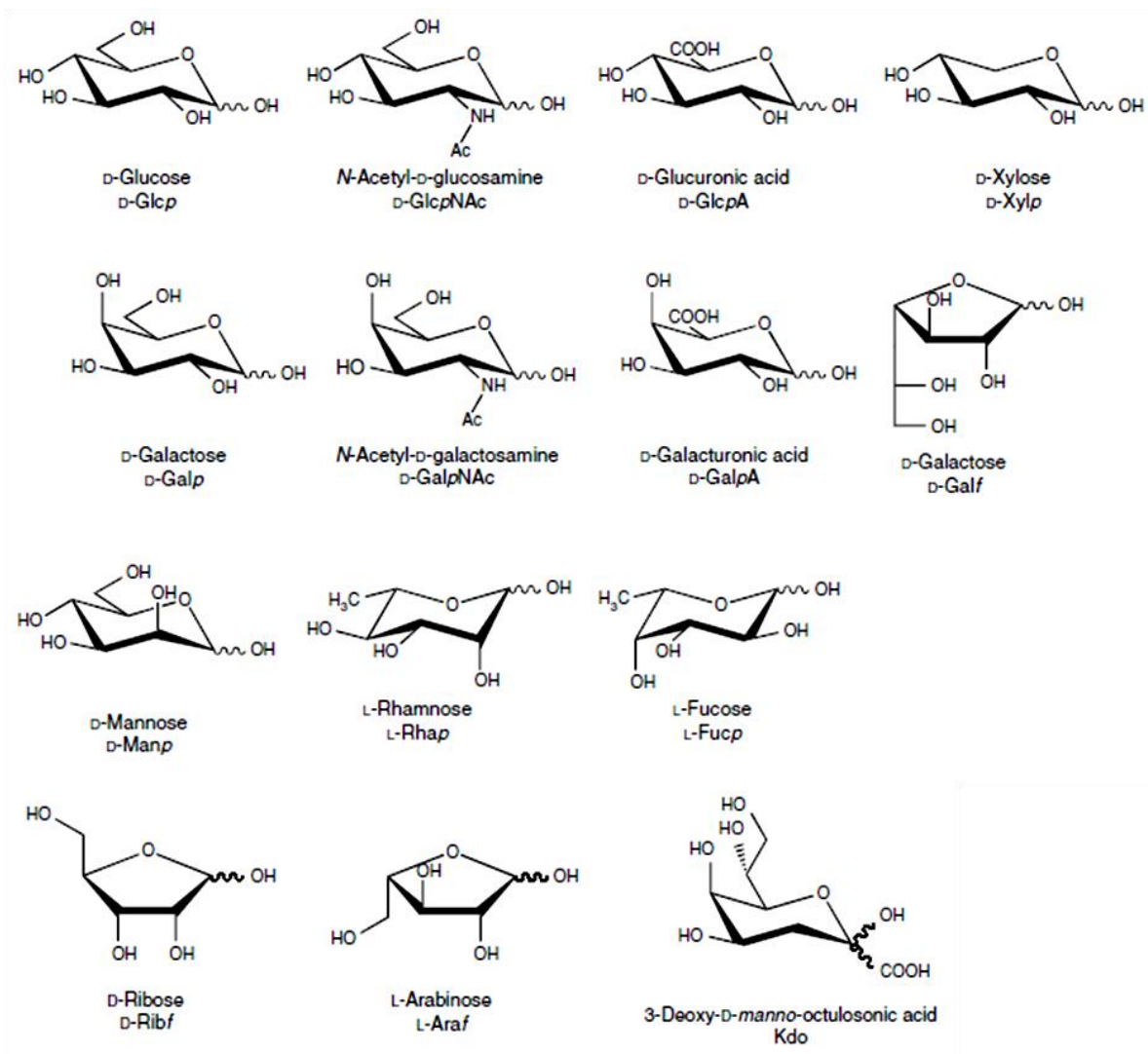
configurations les plus stables. Ces principes biochimiques sont également valables pour les dérivés acides de ces oses neutres, appelés acides uroniques.

Les acides uroniques sont issus d'une oxydation du carbone 6 des hexoses par une déshydrogénase. Les acides uroniques les plus représentés dans les biomasses d'origines naturelles sont l'acide glucuronique (GlcA) et l'acide galacturonique (GalA). Ces acides uroniques sont très présents dans la composition de certains PS de structure des végétaux (pectine) et dans certains EPS bactériens ou microalgaux.

Les acides sialiques sont également des dérivés issus d'oses à 11 atomes de C. Ce sont des molécules très présentes chez les organismes vivants, principalement chez les animaux et dont les fonctions biologiques et physiologiques ne sont pas encore complètement connues. Ces acides proviennent de la condensation d'un acide pyruvique avec du *N*-Acétyl-D-mannosamine.

Enfin, les osamines, incluant les galactosamine (GalN) et glucosamine (GlcN), que l'on qualifie aussi d'oses aminés sont des oses dont l'une des fonctions hydroxyle est remplacée par une fonction amine (NH<sub>2</sub>). Ce groupement aminé peut être acétylé afin d'obtenir des *N*-acétyl-osamine, comme les *N*-acétylgalactosamine (GalNAc) et *N*-acétylglucosamine (GlcNAc).

La **Figure 23** présente différentes structures de monosaccharides qui rentrent dans la composition des PS. Ces monosaccharides s'associent les uns aux autres par des liaisons spécifiques qualifiées d'*O*-glycosidiques. Lorsque le nombre de résidus osidiques liés est supérieur ou égal à 10, on parlera de PS. Cette chaîne principale peut parfois porter des ramifications constituées de monosaccharides terminaux ou de chaînes secondaires composées de plusieurs monosaccharides, identiques ou non. Ces ramifications peuvent également être de nature non osidique. Dans ce cas il est préférable de parler de substituants non-osidiques. Ils peuvent être d'origines organiques, comme les groupements *O*-méthyle et *O*-acétyle, ou bien inorganique. C'est le cas des groupements sulfates qui sont présents sur bon nombre de PS extracellulaires des Rhodophyta. De manière plus spécifique les PS de microalgues peuvent être dissociés en 3 grands groupes suivant leur rôle physiologique : les PS de réserve, les PS de structure, aussi appelé PS pariétaux et les PS matriciels.



**Figure 23** : Principaux monosaccharides constitutifs des polysaccharides naturels (Kamerling & Gerwig, 2007).

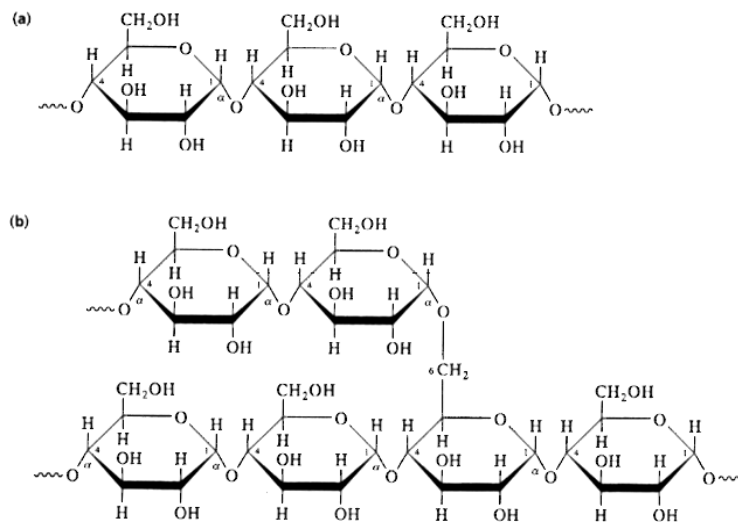
### 3.4.2.1 Les polysaccharides de réserve

Ils sont présents chez tous les organismes vivants. Les microalgues ne font pas exception à la règle puisque certaines espèces, notamment les microalgues vertes sont depuis quelques années très étudiées pour leur capacité à accumuler de grandes quantités de ces biopolymères. Ces macromolécules peuvent être utilisées pour l'élaboration de bioéthanol. Ces biopolymères ont un rôle physiologique important au sein de la cellule. Chez les microorganismes photosynthétiques, la formation des PS de réserve résulte directement du processus de photosynthèse. Ils vont être accumulés et stockés afin de constituer une réserve énergétique et

carbonée. Chaque microorganisme photosynthétique possède un PS de réserve, avec des teneurs variables d'une souche à l'autre (**González-Fernández & Ballesteros, 2012**), mais sa forme de stockage varie en fonction du groupe phylogénétique auquel il appartient.

### 3.4.2.1.1 L'amidon

Chez les Chlorophyta, le PS de réserve est un homopolysaccharide. Il s'agit de l'amidon, un glucane composé de D-glucoses liés en  $\alpha$ -(1,4) et  $\alpha$ -(1,6). L'amidon se présente sous forme de grains semi-cristallins au sein même du chloroplaste (**Usov, 2011 ; Yu *et al.*, 2002**). Il est composé d'amylose et d'amylopectine (**Figure 24**). L'amylopectine est le constituant majoritaire de l'amidon. C'est un polymère d' $\alpha$ -(1,4)-D-glucopyranoses ramifié en  $\alpha$ -(1,6) tous les 24-30 résidus par des chaînes secondaires d' $\alpha$ -(1,4)-D-glucanes. L'amylose est un polysaccharide linéaire composé exclusivement de de D-glucopyranose liés en  $\alpha$ -(1,4).



**Figure 24** : Structures de (a) l'amylose et (b) de l'amylopectine.

Chez les microalgues rouges l'amidon dit « floridéen » est stocké dans le cytoplasme sous forme de grains (**Usov, 2011 ; Yu *et al.*, 2002**). Aussi appelé « glycogène floridéen », il s'agit d'un  $\alpha$ -(1,4)-D-glucane dont la structure est similaire à l'amidon, mais sans amylose (**Usov, 2011**). A noter que de l'amylose a néanmoins été détecté chez *Porphyridium aeruginum*, *Porphyridium purpureum*, *Porphyridium sordidum*, *Rhodorus marinus*, *Rhodella violacea* et *Flintiella sanguinaria* (**McCracken & Cain, 1981 ; Shimonaga *et al.*, 2006 ; Shimonaga *et al.*,**

2008), mais dans des proportions bien moindres que chez les Chlorophyta et les plantes supérieures. A titre d'exemple, la teneur en amylose du glycogène floridéen de *Porphyridium purpureum* et *Flintiella sanguinaria* est < 10 et égale à 23 %, respectivement (Shimonaga *et al.*, 2006 ; McCracken & Cain, 1981). De plus, la longueur de la chaîne, la cristallinité et la fréquence des ramifications de l'amidon des Rhodophyta sont significativement différents de l'amidon des Chlorophyta (Shimonaga *et al.*, 2008). En effet, l'amidon « floridéen » possède une fréquence de ramification généralement comprise entre 9 et 13 résidus de glucose (Hirabaru *et al.*, 2010 ; Shimonaga *et al.*, 2008). Certains auteurs recommandent d'employer plutôt le terme de « semi-amylopectine » plutôt que celui d'amidon « floridéen » pour désigner le polysaccharide de réserve des Rhodophyta.

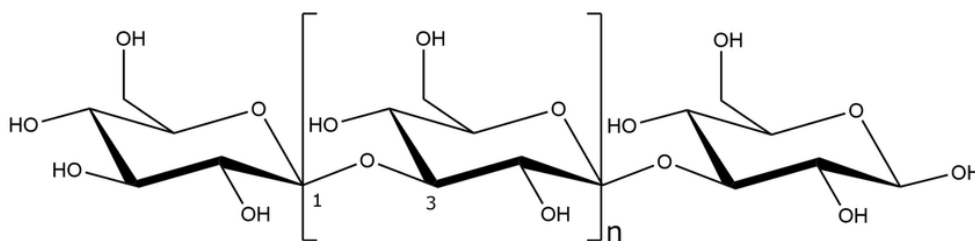
Certaines espèces de microalgues sont capables d'accumuler de grandes quantités d'amidon. Par exemple, *Chlorella vulgaris* peut accumuler 41 % de sa masse sèche en amidon (Dragone *et al.*, 2011), *Chlamydomonas reinhardtii* entre 35 et 44 % (Nguyen *et al.*, 2009 ; Choi *et al.*, 2010), *Dunaliella tertiolecta* et *Tetraselmis chuii* jusqu'à 53 et 49 % de leur masse sèche, respectivement (Gifuni *et al.*, 2018). Un taux encore supérieur a été constaté pour *Tetraselmis subcordiformis* chez qui l'amidon peut représenter jusqu'à 62 % du poids sec (Yao *et al.*, 2012, 2018).

#### 3.4.2.1.2 Le glycogène

PS de réserve chez les animaux et les champignons, le glycogène est également présent chez les Cyanobactéries. Contrairement à l'amidon, il possède une structure cristalline et est présent dans le cytosol. D'un point de vue structural le glycogène est l'équivalent de l'amylopectine de l'amidon puisqu'il s'agit d'un glucane composé d'une chaîne de résidus D-glucose liés en  $\alpha$ -(1,4) et ramifiée en  $\alpha$ -(1,6). La principale différence entre ces deux polymères est un degré de ramification plus élevé pour le glycogène. Dans des conditions de cultures particulières la teneur en glycogène des Cyanobactéries peut être augmentée significativement. Par exemple, lorsque *Arthrospira platensis* est soumise à un flux lumineux important ( $700 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) et cultivée dans un milieu déficient en azote, elle peut accumuler jusqu'à 65 % de son poids sec en glycogène (Aikawa *et al.*, 2012).

### 3.4.2.1.3 Le paramylon

Le paramylon est un polyside spécifique aux Euglènes. Tout comme l'amidon chez les microalgues vertes et le glycogène chez les Cyanobactéries, le paramylon est un homopolysaccharide composé exclusivement de D-glucose (**Figure 25**).



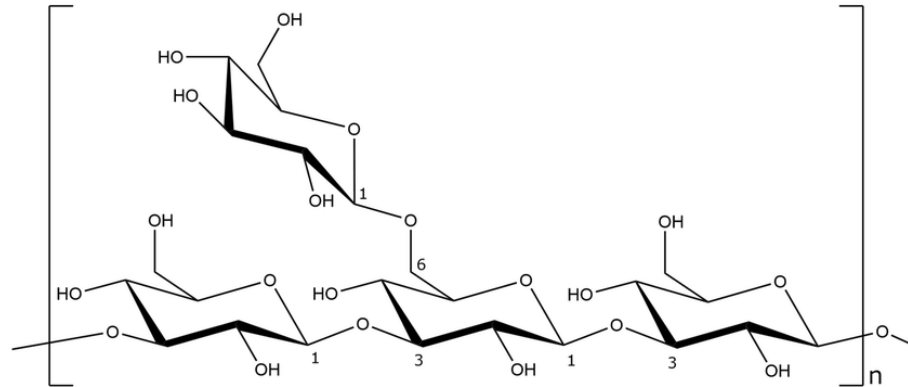
**Figure 25** : Structure du paramylon.

Il s'en différencie néanmoins au niveau de la liaison glycosidique puisque les monosaccharides sont liés en  $\beta$ -(1-3). Cette réserve de carbone cristalline est extra-chloroplastique puisqu'elle se situe dans le cytoplasme. Elle peut atteindre des quantités très importantes chez certaines espèces cultivées en hétérotrophie. En effet, *Euglena gracilis* est capable d'accumuler 75 % de sa masse sèche en paramylon en présence d'une source de carbone organique (Santek *et al.*, 2012) et jusqu'à 90 % pour un mutant non photosynthétique cultivé avec du glucose comme source de carbone (Barsanti *et al.*, 2001).

### 3.4.2.1.4 La laminarine et la chrysolaminarine

Chez les algues brunes, la réserve glucidique se situe au sein de la vacuole et prend la forme de laminarine. Il s'agit d'un polymère de  $\beta$ -(1,3)-D-glucopyranoses comportant des branchements secondaires reliés à la chaîne principale par des liaisons  $\beta$ -(1,6) (**Figure 26**).

La chrysolaminarine est le polysaccharide de réserve des diatomées. Ce polyside est vacuolaire et son nom provient de sa ressemblance structurale avec la laminarine. Il s'en distingue par la présence de mannitol à l'extrémité de certaines chaînes. Les nombreuses études menées sur ce biopolymère chez diverses espèces de diatomées ont permis d'identifier quelques différences structurales au niveau des branchements secondaires et du degré de polymérisation (DP) (Gügi *et al.*, 2015).



**Figure 26** : Structures de la laminarine et de la chrysolaminarine.

Ces branchements secondaires sont reliés à la chaîne principale par des liaisons  $\beta$ -(1,6) chez les diatomées d'eau douce (**Beattie *et al.*, 1961**) et chez les diatomées marines *Phaeodactylum tricornutum*, *Chaetoceros debilis*, *Chaetoceros mülleri* et *Thalassiosira weissflogii* (**Ford & Percival, 1965** ; **Størseth *et al.*, 2005, 2006**). Chez *Skeletonema costatum* la chrysolaminarine possède des branchements secondaires en  $\beta$ -(1,6) mais aussi en  $\beta$ -(1,2) (**Paulsen & Mykkestad, 1978**). Chez *Stauroneis amphioxys* et certaines diatomées de l'antarctique les ramifications sont liées à la chaîne principale en  $\beta$ -(1,6),  $\beta$ -(1,2) et parfois en  $\beta$ -(1,4) (**McConville *et al.*, 1986**). Ces différences sont associées à des variations dans la longueur de la chaîne principale et à des DP différents (*e.g.* DP 30 chez *Chaetoceros debilis*, DP ~24 chez *Stauroneis amphioxys* et DP 22-24 chez *Chaetoceros muelleri*) (**Gügi *et al.*, 2015**). La teneur en chrysolaminarine diffère en fonction de l'espèce étudiée. Elle représente respectivement 9,3, 12,4 et 32,8 % de la matière sèche totale chez *Chaetoceros debilis*, *Thalassiosira gravida* et *Skeletonema costatum* (**Mykkestad, 1989**). De plus la teneur en chrysolaminarine est sujette à des variations au cours de la croissance. Chez *Chaetoceros debilis* elle est multipliée par 6,5 en phase stationnaire par rapport à la phase exponentielle et représente 61 % de la masse sèche totale. Il en est de même pour *Skeletonema costatum* et *Thalassiosira gravida* qui multiplient leurs teneurs respectives par 2,5 et 3 entre ces deux stades de croissance, passant ainsi de 33 à 81 % et de 12 à 34 % du poids sec (**Mykkestad, 1989**).

### 3.4.2.2 Les polysaccharides pariétaux

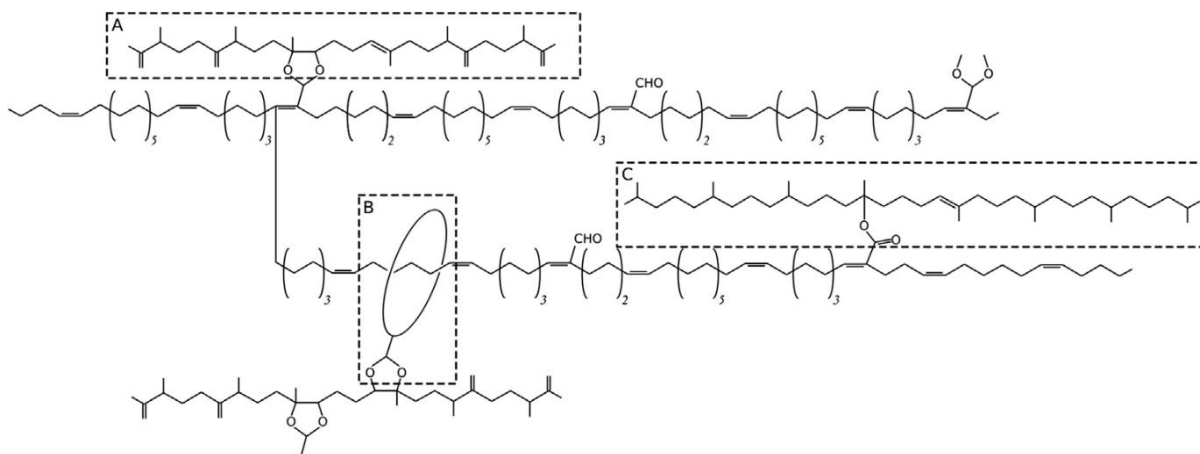
Les PS pariétaux correspondent aux PS des parois cellulaires. Ils jouent un rôle important dans la structure cellulaire. La paroi cellulaire des algues possède une architecture semblable à celle des plantes terrestres. Il s'agit d'une structure biphasique, composée d'un squelette de microfibrilles cristallines et d'une phase matricielle. Elle diffère cependant par son organisation (importance de la phase matricielle par rapport à la phase microfibrillaire) et sa composition (abondance des PS anioniques par rapport aux PS neutres, et présence de PS originaux) (Kloareg & Quatrano, 1988).

#### 3.4.2.2.1 PS pariétaux des Chlorophyta

Cette sous partie n'est pas exhaustive. Elle présente seulement quelques exemples parmi les divers PS pariétaux des Chlorophyta afin d'illustrer la large diversité des compositions. La revue de Baudalet *et al.* (2017) qui regroupe l'ensemble des informations structurales des parois des microalgues vertes (architectures des différentes couches et compositions) est disponible pour plus d'informations.

La plupart des Chlorophyta présentent dans leurs parois cellulaires la même organisation architecturale (phases matricielle et fibrillaire) que les parois des Streptophyta (Charophyta et plantes terrestres) (Popper & Tuohy, 2010 ; Domozych, 2015). Cependant, des architectures originales sont régulièrement rencontrées chez les Chlorophyta, et les compositions de leurs parois sont très variées. La paroi de *Botryococcus braunii* est composée de  $\beta$ -(1,3)-glucanes et/ou de  $\beta$ -(1,4)-glucanes (Weiss *et al.*, 2012). Cette microalgue possède également une gaine trilaminaire constituée d'algaenane, une macromolécule aliphatique insoluble (Figure 27 ; Nguyen *et al.*, 2003).

La paroi cellulaire des microalgues du genre *Coccomyxa* est composée de 3 couches quelle que soit l'espèce. Chez *Coccomyxa solarina-saccatae* on retrouve 28 % de (1,4)-glucane et 14 % de (1,4)-mannane (Centeno *et al.*, 2016). De la cellulose a aussi été suspectée dans la phase fibrillaire (couche intermédiaire). Les espèces du genre *Coccomyxa* ont également des enveloppes entourées d'une matrice, composée de galactofurananes présentant des ramifications riches en Rha (Centeno *et al.*, 2016).



**Figure 27** : Structures des l'algaenanes isolés chez *Botryococcus braunii* (A) variété B, (B) variétés B et L et (C) variété L (Baudeflet *et al.*, 2017).

La paroi des *Chlorella* peut être composée de 1 ou 2 couches (avec ou sans structure trilaminaire). Cette paroi est divisée en deux parties : une partie composée « d'hémicellulose » et une partie composée principalement de GlcN (présence de Gal et Rha en plus faibles proportions) intégrée dans un PS similaire à la chitine (Takeda, 1991 ; Northcote *et al.*, 1958 ; Takeda & Hirokawa, 1978). Chez *Chlorella vulgaris* ces parties représentent 22-25 et 60-66 % de la paroi (Abo-Shady *et al.*, 1993). Chez *Chlorella protothecoides*, la paroi est constituée de PS riches en Man et Glc mais dépourvus de GlcN. Les parois cellulaires de *Chlorella vulgaris* présentent également des glucides originaux dans leurs compositions tels que le 2-*O*-méthyl et le 3-*O*-méthyl-Rha (Ogawa *et al.*, 1997), des PS originaux contenant des séquences de 3-*O*- $\alpha$ -D-glucopyranurosyl-L-rhamnopyranose (Ogawa *et al.*, 1998),  $\alpha$ -D-glucopyranurosyl-(1,3)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1,2)- $\alpha$ -L-rhamnopyranose (Ogawa *et al.*, 1999). Un  $\beta$ -D-galactane contenant 8 % de résidus 3-*O*-méthyl-D-galactose (Ogawa *et al.*, 2001), un nouveau type d'arabinogalactane (Suárez *et al.*, 2005) et d'arabinomannane (Pieper *et al.*, 2012) ont également été décrits. Sugimoto *et al.* (2004) ont également par ailleurs rapporté la présence d'un PS composé principalement de GlcA, substitué en positions C-2 ou C-3 par des résidus Ara, Gal et GlcNAc dans la paroi de *Chlorella* (NC64A), *Chlorella vulgaris* et *Chlorella protothecoides*.

La paroi de *Scenedesmus* est composée de deux couches : une couche homogène microfibrillaire épaisse et une gaine trilaminaire (Bisalputra & Weier, 1963 ; Staehelin &



**Pickett-Heaps, 1975**). Une couche supplémentaire, appelée « adhésif coenobial » associe quatre cellules sous forme de colonie (coenobium) (**Stahelin & Pickett-Heaps, 1975**). La gaine trilaminaire est composée d'algaenane et la couche microfibrillaire épaisse est composée d'un « matériel cellulosique » (**Rodríguez et al., 1999**). La paroi des espèces appartenant au genre *Scenedesmus* contient 40 % d'oses neutres, 2 % d'acides uroniques, 15 % de protéines et 43 % de matériel non identifié (**Blumreisinger et al., 1983**). Celle de *Scenedesmus fuscus* est composée de 75 % de Glc et 25 % de Man (**Takeda, 1996**) tandis que celle des espèces du genre *Ankistrodesmus* est principalement composée de Man (79 %) et Glc (19 %), avec des traces de Rha et Xyl (**Takeda & Hirokawa, 1978, 1984**).

La paroi de *Haematococcus pluvialis* est divisée en trois couches et les cellules sont entourées d'une matrice extracellulaire mucilagineuse (**Hagen et al., 2002**). Cette matrice contient des glucides (principalement du mannose) et des protéines, représentant 19 et 75 % de sa composition, respectivement. La cellulose est absente mais des groupements sulfates ont été détectés (**Hagen et al., 2002**). L'algaenane confère une forte rigidité à la paroi cellulaire (**Montsant et al., 2001**).

La composition de la paroi des Prasinophyta, aussi appelée thèque est très variable. Chez *Tetraselmis striata*, elle est constituée de 82 % d'acides uroniques (**Becker et al., 1991**), et des composants inhabituels peuvent être rencontrés, tels que l'acide 3-désoxy-D-manno-2-octoluonique (Kdo), le 5-O-Me-Kdo, l'acide guluronique (GulA) et l'acide 3-deoxy-lyxo-2-heptulosarique (Dha) (**Becker et al., 1998**). Le Kdo, GalA et Dha peuvent représenter jusqu'à 60, 21 et 17 % de la composition de la thèque de *Tetraselmis striata*, respectivement. Des groupements sulfates ont aussi été détectés (**Becker et al., 1995**), tout comme chez *Nephroselmis olivacea*, *Polyblepharides amyliifera* et *Mantoliella squamata* (**Becker et al., 1991**).

#### **3.4.2.2.2 PS pariétaux des Rhodophyta**

Contrairement aux Chlorophyta, les Rhodophyta ne possèdent pas de paroi cellulaire. Le squelette microfibrillaire cristallin (matériel cellulosique) est absent (**Kloareg & Quatrano, 1988**) et les cellules possèdent uniquement une membrane encapsulée dans une matrice de PS (phase polysaccharidique matricielle) (**Figure 3, Arad & Levy-Ontman, 2010**). Une partie de ces PS est excrétée dans le milieu sous forme de PS solubles et l'autre partie (jusqu'à 50 %) reste liée à la membrane plasmique (fraction non soluble) (**Arad & Levy-Ontman, 2010 ; Geresh &**

**Arad, 1991**). Cette dernière constitue la « paroi cellulaire » des Rhodophyta. Diverses fonctions lui ont été attribuées : support mécanique, échange et capture d'ions et protection vis-à-vis de l'environnement (dessiccation, température, pH et salinité) (**Arad & Levy-Ontman, 2010**). Des études sur *Porphyridium* sp. ont démontré la présence de glycoprotéines (66 kDa) liées de façon non covalente à la membrane, et composées d'une fraction polypeptidique (~58 kDa), d'un homoglucone (~8 kDa), de groupements sulfates et d'un hétéropolymère (Xyl, Gal, Glc et GlcA) (**Cohen & Arad, 1998 ; Shrestha, 1999 ; Shrestha et al., 2004**). Le poids moléculaire du polymère de *Rhodella* varie entre 2 et  $7 \times 10^6$  Da (**Evans et al., 1974 ; Fareed & Percival, 1977**).

#### 3.4.2.2.3 PS pariétaux des Charophyta

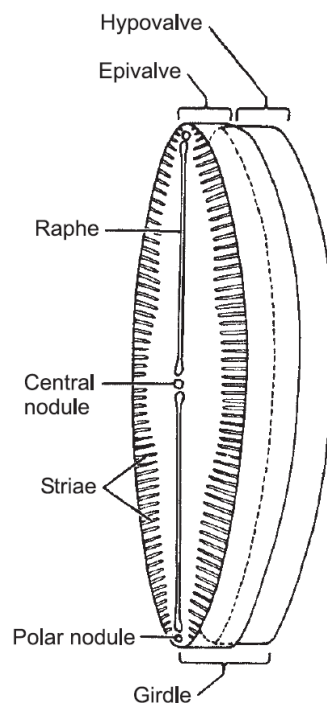
La paroi de *Micrasterias*, une microalgue appartenant à l'ordre des Desmidiiales est composée d'un homogalacturonane (HG) constitué de  $\alpha$ -(1,4)-GalA, parfois méthylé ou acétylé en position C-6 ou C-2, respectivement (**Lütz-Meindl & Brosch-Salomon, 2000 ; Domozych, 2015**). Cet HG, assimilé à de la pectine est également retrouvé dans les parois de *Netrium digitus* et *Closterium acerosum* (**Eder & Lütz-Meindl, 2010 ; Baylson et al., 2001**). La paroi de *Penium margaritaceum* est formée de 3 couches : une couche externe contenant un maillage de  $\text{Ca}^{2+}$ -HG, une couche interne microfibrillaire de cellulose et la couche intermédiaire contenant l'HG se situe à l'interface entre ces deux couches polymériques (**Domozych et al., 2007, 2009**).

#### 3.4.2.2.4 PS pariétaux des Chromista

L'algaenane, présent au sein de nombreuses Chlorophyta et Dinophyta (**Blokker et al., 1998 ; Gelin et al., 1999**) est également présent dans la paroi de *Nannochloropsis oculata* (Chlorophyta) (**Zhang & Volkman., 2017**) mais est absent chez les Haptophyta telles que *Emiliana huxleyi* et *Phaeocystis* sp. (**Gelin et al., 1999**).

Les parois des diatomées possèdent une structure spécifique dépourvue d'algaenane comme cela a été démontré chez les espèces *Chaetoceros calcitrans*, *Chaetoceros muelleri*, *Nitzschia palea* et *Skeletonema costatum* (**Gelin et al., 1999**). Elles sont généralement décrites comme des cellules individuelles avec un protoplaste (cellule végétale débarrassée de sa paroi cellulosique externe) incluses dans un frustule siliceux qui correspond à la vraie paroi cellulaire

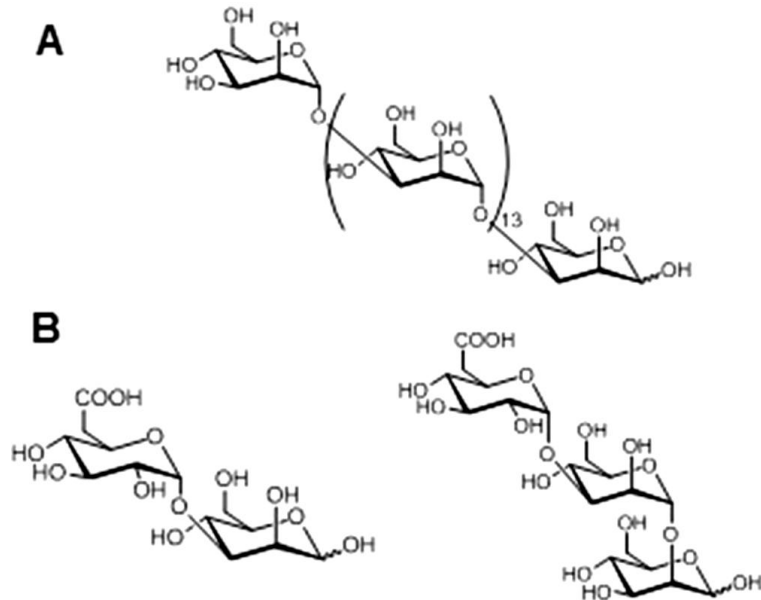
des diatomées et est composée de deux valves (ou thèque) chevauchantes : l'épithèque supérieure plus grande et l'hypothèque inférieure plus petite (**Figure 28**). La géométrie particulière du frustule est caractéristique de chaque diatomée. Ce frustule est associé à diverses matières organiques, principalement des protéines (**Nakajima & Volcani, 1969 ; Hecky et al., 1973**), des polyamines (**Kröger et al., 1999**) et une fine couche de PS qualifiée de mucilage (similaire à la fraction matricielle des Chlorophyta et Rhodophyta) qui entre en jeu lors de la mobilité de la cellule et de son adhésion éventuelle à un substrat. Le frustule et l'infime couche organique qui le recouvre constituent la paroi cellulaire des diatomées (**Kröger et al., 1994**).



**Figure 28** : Structure de la diatomée pennale *Pinnularia* (**Armstrong & Brasier, 2005**).

L'analyse de la paroi de la diatomée marine *Cylindrotheca fusiformis* a révélé la présence de quatre glycoprotéines d'une masse moléculaire d'environ 75 kDa. Ces glycoprotéines sont constituées de domaines de répétitions de liaison aux ions  $\text{Ca}^{2+}$  séparés par des segments polypeptidiques contenant de l'hydroxyproline (**Kröger et al., 1994**). Trois familles de protéines ont été isolées de *Cylindrotheca fusiformis* : les frustulines, les pleuralines et les silaffines. Ces glycoprotéines seraient responsables de la formation du frustule siliceux (**Kröger et al., 1994**).

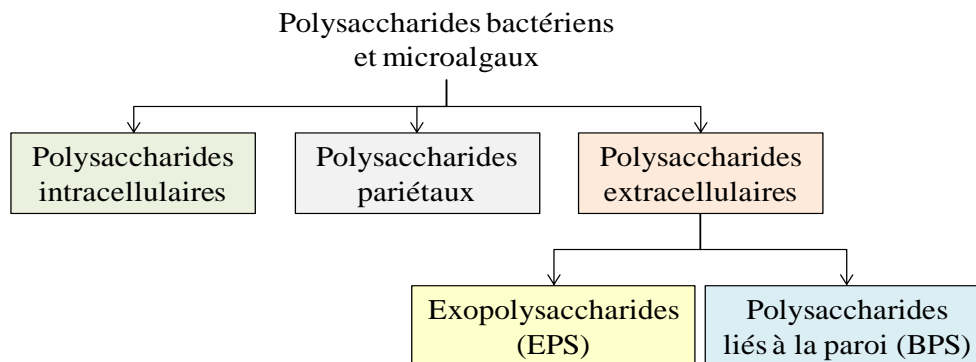
De nombreuses études ont caractérisé la composition en monosaccharides des PS constitutifs de la couche matricielle des parois des diatomées. Leur extraction conduit à l'obtention de 3 fractions : i) une fraction soluble en condition alcaline à chaud, ii) une fraction insoluble en condition alcaline à chaud (ces deux fractions sont obtenues après des extractions répétées au NaOH 1 M) et iii) une fraction composée de matériels insolubles constitutifs de la paroi cellulaire (obtenue par des traitements enzymatiques (*e.g.* chitinase, glucanase) et NaOH 1 M successifs sur la fraction insoluble en condition alcaline à chaud) (Fontaine *et al.*, 2000). La composition de ces fractions varie en fonction des espèces et des méthodes d'extractions (Gügi *et al.*, 2015) mais le Man est le monosaccharide majoritaire dans la plupart des cas. Des résultats similaires ont été obtenus pour les espèces *Pinnularia viridis*, *Craspedostauros australis*, *Thalassiosira pseudonana* et *Nitzschia navis-varin-gica* (Chiovitti *et al.*, 2005). Les analyses ont révélé que les PS représentaient entre 0,9 et 1,8 % de la paroi globale (incluant le frustule de silice). Le Man était le monosaccharide dominant dans les matrices des quatre espèces (54 à 69 %). Quatorze autres monosaccharides, incluant des oses neutres, parfois méthylés (Glc, Gal, Xyl, Ara, Rha, Fuc et 2-*O*-Me-Rha, 3-*O*-Me-Rha, 2,3-*O*-Me-Rha, 3-*O*-Me-Xyl, 4-*O*-Me-Xyl) et des acides uroniques, parfois méthylés (GlcA, GalA et 2-*O*-Me-GlcA) ont également été détectés dans des proportions moindres et variables, ainsi que la présence de substituants sulfates. Les PS du frustule de *Phaeodactylum tricornutum* extraits par Ford & Percival (1965) ont également révélé la présence majoritaire du Man, GlcA et de groupements sulfates (Figure 29). Les diatomées *Cyclotella* et *Thalassiosira* produisent des fibres de chitine rigides et hautement cristallines (poly-D-GlcNAc) comme démontré par des méthodes chimiques, enzymatiques et de cristallographie (Dweltz *et al.*, 1968 ; Blackwell *et al.*, 1967 ; Lindsay & Gooday, 1985). Cette  $\beta$ -chitine présente une structure cristalline similaire à celle décrite chez *Tevnia jerichonana* et *Lamellibrachia* (vers) (Gaill *et al.*, 1992 ; Ogawa *et al.*, 2011) mais différente de celle des arthropodes, des crustacés et des champignons, qui synthétisent tous une  $\alpha$ -chitine. Les chaînes d' $\alpha$ -chitine s'organisent en structures non parallèles, contrairement aux chaînes de  $\beta$ -chitine (Gügi *et al.*, 2015).



**Figure 29** : Structures hypothétiques des oligosaccharides caractérisés lors de l’analyse des PS de la paroi cellulaire de *Phaeodactylum tricornutum*. (A) squelette de  $\alpha$ -(1,3)-Manp et (B) fragments d’oligosaccharides. Bien que des liaisons  $\alpha$  soient proposées ici, il n’existe aucune preuve établie du type de liaisons impliquées dans ces structures (Ford & Percival, 1965).

### 3.4.2.3 Les polysaccharides matriciels

Les PS peuvent aussi jouer le rôle de matrice extracellulaire. Cette phase matricielle hydrosoluble de nature mucilagineuse, parfois associée à des protéines, est de nature très complexe. Elle joue un rôle important dans la formation des biofilms et des colonies chez les Cyanobactéries. Ces biopolymères sont excrétés dans le milieu extérieur de la cellule et peuvent rester liés à ses enveloppes ou bien être complètement excrétés dans l’environnement (**Figure 30**).



**Figure 30** : Classification des polysaccharides bactériens et microalgaux (adapté de **Prasanna, 2018**).

Les définitions de chacune de ces catégories ne sont aujourd’hui pas bien définies et la frontière entre elles est très mince. Plusieurs termes existent pour désigner les PS appartenant à la première catégorie : matrice mucilagineuse, polysaccharides capsulaires (CPS, Capsular PolySaccharides) ou polysaccharides liés à la paroi (BPS). Il en est de même pour la deuxième catégorie puisqu’il n’est pas rare de voir les termes suivants employés : exopolysaccharides (EPS), polysaccharides extracellulaires ou polysaccharides libérés (RPS, Released PolySaccharides). Malgré ces distinctions il n’est pas inhabituel de trouver dans certaines publications la qualification d’EPS alors même que les études portent sur des BPS. Dans la plupart des études, les BPS sont qualifiés d’EPS suite à une étape de décrochage par divers processus afin d’en étudier la composition et les caractéristiques physico-chimiques.

Ces PS extracellulaires (EPS et BPS) se sont vus attribués plusieurs rôles : fixation d’éléments nutritifs essentiels et de micronutriments présents dans l’environnement, adhésion à des surfaces, formation de biofilms (incluant des bactéries), formation d’une barrière protectrice vis-à-vis des biocides et autres agents antimicrobiens, et lutte contre la prédation (**Hoagland et al., 1993 ; Shnyukova & Zolotareva, 2017 ; Prasanna, 2018**). L’intérêt de la communauté scientifique pour les EPS produit par les microalgues et les Cyanobactéries est assez récent, comme décrit par **Rossi & De Philippis (2016)**. La première publication mettant en évidence la production d’EPS par une microalgue a été publiée par **Tischer & Moore (1964)** et révèle la composition en monosaccharides du polymère de *Palmella mucosa*. Depuis, le nombre de souches identifiées comme productrices d’EPS ne cesse d’augmenter (**Tableau 3**).

**Tableau 3, partie 1** : Caractérisations structurales des EPS de microalgues et de Cyanobactéries.

Genres (phyla)	Espèces	Rha	Gal	Ara	Glc	GlcA	GalA	Man	Fuc	Xyl	Rib	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Protéines	Autres informations	Références
<i>Achnanthes</i> (Oc)	<i>longipes</i>	+	+++	+	+	+	-	+	++	+	-	nd	nd		Wustman <i>et al.</i> (1997)
	<i>coffeaiformis</i>	+	++	+	+	nd	nd	+	+++	+	nd	nd	nd		Wustman <i>et al.</i> (1997)
<i>Amphora</i> (Oc)	<i>holsatica</i>	+	nd	+	+	nd	nd	nd	+	+	nd	nd	nd		Richert <i>et al.</i> (2005)
	<i>rostrata</i>	+	++	+	+	nd	nd	+	+++	+	nd	+	+	Pyruvate	Khandeparker & Bhosle (2001)
	sp.	-	+	-	-	+++	-	+	+	++	-	nd	nd	GlcN, traces de GlcNAc	Jin <i>et al.</i> (2018)
<i>Ankistrodesmus</i> (Chl)	<i>densus</i>	+	++	+	+	nd	nd	+	+++	+	-	-	nd	Infos liaisons, groupements méthyles	Paulsen <i>et al.</i> (1998)
<i>Asterionella</i> (Oc)	<i>socialis</i>	+++	tr	-	tr	+	-	+	tr	tr	-	nd	nd		Allan <i>et al.</i> (1972)
<i>Aulacoseira</i> (Oc)	<i>granulata</i>	+++	+	nd	+	+	-	+	+	++	nd	nd	nd	GlcNAc	Gouvêa <i>et al.</i> (2005)
<i>Botryococcus</i> (Chl)	<i>braunii</i>	+	+++	+	tr	tr	-	tr	++	+	-	nd	+		Allard & Casadevall (1990)
<i>Bracteacoccus</i> (Chl)	sp.	++	++	+	+++	nd	nd	+	+	+	-	+	nd		Barberousse <i>et al.</i> (2006)
<i>Chaetoceros</i> (Oc)	<i>affinis</i>	++	+	-	-	nd	nd	-	+++	-	-	+	nd		Myklestad <i>et al.</i> (1972)
	<i>curvisetus</i>	+	++	-	-	nd	nd	-	+++	-	-	+	nd	Infos liaisons	Paulsen <i>et al.</i> (1975)
	<i>decipiens</i>	+++	++	-	+	nd	nd	+	+++	+	-	nd	nd	Infos liaisons	Urbani <i>et al.</i> (2012)
	<i>debilis</i>	+	++	-	+	nd	nd	+	+++	+	-	nd	nd		Haug & Myklestad (1976)
<i>Chlamydomonas</i> (Chl)	<i>agustae</i>	-	+	+	+++	++	-	+	-	+	-	nd	+	Infos liaisons	Allard & Tazi (1992)
	<i>corrosa</i>	-	+++	++	+	-	+	-	-	-	-	nd	+	Infos liaisons	Allard & Tazi (1992)
	<i>humicola</i>	+	+	++	++	+	-	-	-	+++	-	nd	+		Flaibani <i>et al.</i> (1989)
	<i>peterfii</i>	-	+++	+	+	-	++	-	-	-	-	nd	+		Flaibani <i>et al.</i> (1989)
	<i>reinhardtii</i>	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	nd	-	Pyruvate	Bafana (2013)

+++ : 1<sup>er</sup> monosaccharide, ++ : 2<sup>nd</sup> monosaccharide, + : présence, - : absence, tr : traces, nd : non déterminé, Cha : Charophyta, Chl : Chlorophyta, Mi : Miozoa, Oc : Ochrophyta, Rh : Rhodophyta

**Tableau 3, partie 2** : Caractérisations structurales des EPS de microalgues et de Cyanobactéries.

Genres (phyla)	Espèces	Rha	Gal	Ara	Glc	GlcA	GalA	Man	Fuc	Xyl	Rib	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Protéines	Autres informations	Références
<i>Chlamydomonas</i> (Chl)	<i>mexicana</i>	+	+	+	+++	nd	nd	+	++	+	+	nd	nd		Barclay & Lewin (1985)
	<i>sajao</i>	+	+++	++	+	nd	nd	+	-	+	-	nd	nd		Barclay & Lewin (1985)
	<i>sajao</i>	-	+++	+	+	-	++	-	-	-	-	nd	+		Flaibani <i>et al.</i> (1989)
	<i>stigmatophora</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd		Kaplan <i>et al.</i> (1987b)
	sp.	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	nd	nd		Moore & Tischer (1964)
<i>Chlorella</i> (Chl)	<i>autotrophica</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd		Fábregas <i>et al.</i> (1999b)
	<i>Mirabilis</i> (678F)	+	+++	++	+	nd	nd	+	+	+	-	+	nd		Barberousse <i>et al.</i> (2006)
	<i>Mirabilis</i> (7410G)	+	+++	+	+	nd	nd	+	++	+	-	tr	nd		Barberousse <i>et al.</i> (2006)
	<i>ellipsoidea</i>	+	+++	+	+	nd	nd	++	+	+	+	+	nd		Barberousse <i>et al.</i> (2006)
	<i>pyrenoidosa</i>	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	nd	nd		Maksimova <i>et al.</i> (2004)
	<i>vulgaris</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	nd	nd		Moore & Tischer (1964)
	<i>ellipsoidea</i>	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	nd	nd		Moore & Tischer (1964)
sp.	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	nd	nd		Moore & Tischer (1964)	
<i>Closterium</i> (Cha)	sp.	+	+	+	+	+++	-	+	++	+	-	nd	nd	Infos liaisons	Domozych <i>et al.</i> (1993)
<i>Cochlodinium</i> (Mi)	<i>polykrikoides</i>	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-		Hasui <i>et al.</i> (1995)
<i>Coscinodiscus</i> (Oc)	<i>nobilis</i>	+	tr	-	+	+	-	++	+++	+	nd	+	nd		Percival <i>et al.</i> (1980)
<i>Cosmarium</i> (Cha)	sp.	+	++	+	+	nd	nd	+	+++	+	+	+	+		Kiemle <i>et al.</i> (2007)
<i>Cryptocodinium</i> (Mi)	<i>cohnii</i>	nd	++	nd	+++	nd	nd	+	+	nd	+	nd	nd		Liu <i>et al.</i> (2015)
<i>Cylindrotheca</i> (Oc)	<i>closterium</i>	+	+	-	++	nd	nd	+	nd	+++	nd	-	+		Staats <i>et al.</i> (1999)

+++ : 1<sup>er</sup> monosaccharide, ++ : 2<sup>nd</sup> monosaccharide, + : présence, - : absence, tr : traces, nd : non déterminé, Cha : Charophyta, Chl : Chlorophyta, Mi : Miozoa, Oc : Ochrophyta, Rh : Rhodophyta



**Tableau 3, partie 3** : Caractérisations structurales des EPS de microalgues et de Cyanobactéries.

Genres (phyla)	Espèces	Rha	Gal	Ara	Glc	GlcA	GalA	Man	Fuc	Xyl	Rib	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Protéines	Autres informations	Références
<i>Cylindrotheca</i> (Oc)	<i>fusiformis</i>	+	+++	-	++	nd	nd	+	+	+	-	+	nd		Magaletti <i>et al.</i> (2004)
<i>Cymbella</i> (Oc)	<i>cistula</i>	+	+++	tr	+	-	-	+	-	++	-	nd	nd		Wustman <i>et al.</i> (1997)
	<i>mexicana</i>	+	+++	tr	+	tr	-	+	+	++	-	nd	nd		Wustman <i>et al.</i> (1997)
<i>Cyclotella</i> (Oc)	<i>nana</i>	+++	++	-	+	+	nd	+	tr	+	+	nd	nd		Allan <i>et al.</i> (1972)
<i>Dixoniella</i> (Rh)	<i>grisea</i>	++	+	+	+	+	-	tr	tr	+++	-	nd	+	Groupements méthyles	Capek <i>et al.</i> (2008)
<i>Desmococcus</i> (Chl)	<i>olivaceus</i>	+	+++	+	++	tr	tr	+	+	+	-	nd	+	Infos liaisons	Hu <i>et al.</i> (2003)
	<i>bardawil</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd		Fabregas <i>et al.</i> (1999)
<i>Dunaliella</i> (Chl)	<i>tertiolecta</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd		Fabregas <i>et al.</i> (1999)
	<i>salina</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	nd	nd		You & Barnett (2004)
<i>Flintiella</i> (Rh)	<i>sanguinaria</i>	+	++	+	+	+	-	-	-	+++	-	tr	+	Groupements méthyles et acétyles	Gaignard <i>et al.</i> (2018)
<i>Geminella</i> (Chl)	<i>terricola</i>	++	+	+	+	nd	nd	+++	+	+	-	+	nd		Barberousse <i>et al.</i> (2006)
<i>Gyrodinium</i> (Mi)	<i>impudicum</i>	-	+++	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+		Yim <i>et al.</i> (2003)
<i>Haematococcus</i> (Chl)	<i>lacustris</i>	nd	++	nd	+	nd	nd	+++	nd	nd	nd	tr	tr		Park <i>et al.</i> (2011)
<i>Heterosigma</i> (Chl)	<i>akashiwo</i>	++	+	+	+	+	-	+++	+	+	nd	+	tr	ManA, infos liaisons	Lopes <i>et al.</i> (2012)
<i>Hyalotheca</i> (Cha)	<i>dissiliens</i>	+	++	+	-	+++	-	-	+	+	-	nd	nd	Infos liaisons	Vieira & Paulsen (1994)
	<i>flaccidum</i> (749B)	++	+	+	+	nd	nd	+++	+	+	-	-	nd		Barberousse <i>et al.</i> (2006)
<i>Klebsormidium</i> (Cha)	<i>flaccidum</i> (748A)	+	+	+	tr	nd	nd	+++	++	+	-	+	nd		Barberousse <i>et al.</i> (2006)
	<i>flaccidum</i> (446C)	+++	+	+	+	nd	nd	++	+	+	-	tr	nd		Barberousse <i>et al.</i> (2006)

+++ : 1<sup>er</sup> monosaccharide, ++ : 2<sup>nd</sup> monosaccharide, + : présence, - : absence, tr : traces, nd : non déterminé, Cha : Charophyta, Chl : Chlorophyta, Mi : Miozoa, Oc : Ochrophyta, Rh : Rhodophyta

**Tableau 3, partie 4** : Caractérisations structurales des EPS de microalgues et de Cyanobactéries.

Genres (phyla)	Espèces	Rha	Gal	Ara	Glc	GlcA	GalA	Man	Fuc	Xyl	Rib	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Protéines	Autres informations	Références
<i>Melosira</i> (Oc)	<i>nummuloides</i>	+	tr	+	+	nd	nd	nd	+	+	nd	nd	nd		Leandro <i>et al.</i> (2003)
<i>Micrasterias</i> (Cha)	<i>denticulata</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd		Oertel <i>et al.</i> (2004)
	<i>directa</i>	+	+	+	++	nd	nd	nd	+++	+	nd	nd	nd		Leandro <i>et al.</i> (2003)
<i>Navicula</i> (Oc)	<i>incerta</i>	+++	+	tr	tr	+	nd	+	++	+	-	nd	nd		Allan <i>et al.</i> (1972)
	<i>salinarum</i>	+	+	-	+++	nd	nd	+	nd	++	nd	+	+		Staats <i>et al.</i> (1999)
	<i>subinflata</i>	+	++	+	+++	nd	nd	+	+	+	+	+	+	Pyruvate	Bhosle <i>et al.</i> (1995)
	<i>digitus</i>	+	+	+	+	nd	nd	+	+++	++	tr	+	+		Kiemle <i>et al.</i> (2007)
<i>Netrium</i> (Cha)	<i>interruptum</i>	+	+	+	+	nd	nd	+	++	+++	+	+	+		Kiemle <i>et al.</i> (2007)
	<i>oblongum</i>	+	+++	+	+	nd	nd	+	+	++	tr	+	+		Kiemle <i>et al.</i> (2007)
<i>Nitzschia</i> (Oc)	<i>angularis</i>	++	+	+	tr	+	nd	+	+	+	-	nd	nd	Autre ose majoritaire	Allan <i>et al.</i> (1972)
	<i>frustulum</i>	++	tr	tr	tr	+	nd	+++	tr	tr	tr	nd	nd		Allan <i>et al.</i> (1972)
<i>Oocystis</i> (Chl)	sp.	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	nd	nd		Moore & Tischer (1964)
<i>Palmella</i> (Chl)	<i>mucosa</i>	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	nd	nd		Moore & Tischer (1964)
	<i>cylindrus</i>	+	+	+	+	nd	nd	+	+++	++	tr	+	nd		Kiemle <i>et al.</i> (2007)
<i>Penium</i> (Cha)	<i>spirostriolatum</i>	+	++	+++	+	nd	nd	+	+	+	tr	+	+		Kiemle <i>et al.</i> (2007)
	<i>margaritaceum</i>	-	+	+	+	+	-	+	++	+++	-	nd	nd	Groupements méthyles	Domozych <i>et al.</i> (2005)
<i>Pinolaria</i> (Oc)	<i>viridis</i>	+++	++	+	+	nd	nd	+	+	+	tr	tr	tr	Gal NAc, trace GlcNAc, groupements méthyles	Chiovitti <i>et al.</i> (2003)
<i>Pleurotaenium</i> (Cha)	<i>trabecula</i>	+	+	+	+	+	+	+	++	+++	+	+	+		Kiemle <i>et al.</i> (2007)

+++ : 1<sup>er</sup> monosaccharide, ++ : 2<sup>nd</sup> monosaccharide, + : présence, - : absence, tr : traces, nd : non déterminé, Cha : Charophyta, Chl : Chlorophyta, Mi : Miozoa, Oc : Ochrophyta, Rh : Rhodophyta

**Tableau 3, partie 5** : Caractérisations structurales des EPS de microalgues et de Cyanobactéries.

Genres (phyla)	Espèces	Rha	Gal	Ara	Glc	GlcA	GalA	Man	Fuc	Xyl	Rib	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Protéines	Autres informations	Références
	<i>aerugineum</i>	-	++	-	+	+	-	-	-	+++	-	+	+	Groupements méthyles	Percival & Foyle (1979)
	<i>cruentum</i>	+	+++	+	++	nd	nd	+	+	+	-	+	+		de Jesus Raposo <i>et al.</i> (2014)
<i>Porphyridium</i> (Rh)	<i>cruentum</i>	-	++	-	+	+	-	-	-	+++	-	+	+	Groupement méthyles	Percival & Foyle (1979)
	<i>marinum</i>	-	++	-	+	+	-	-	tr	+++	-	+	nd		Soanen <i>et al.</i> (2016)
	<i>purpureum</i>	-	+++	-	+	-	-	-	tr	++	-	+	-		Roussel <i>et al.</i> (2015)
	sp.	-	++	-	+	nd	nd	-	-	+++	-	+	nd	Infos liaisons	Geresh <i>et al.</i> (2009)
	<i>maculata</i>	+	+++	+	+	+	-	-	-	++	-	+	+		Roussel <i>et al.</i> (2013)
<i>Rhodella</i> (Rh)	<i>reticulata</i>	+	+	-	++	+	-	+	-	+++	+	nd	+		Cohen & Arad (1998)
	<i>violacea</i>	++	+	+	+	+	-	-	-	+++	-	+	+		Villay <i>et al.</i> (2013)
<i>Scenedesmus</i> (Chl)	<i>quadricauda</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd		Mohamed (2008)
<i>Spondylosium</i> (Cha)	<i>panduriforme</i>	tr	++	+	+	+	-	-	++	+	-	-	+	Infos liaisons	Paulsen & Vieira (1994)
<i>Staurastrum</i> (Cha)	<i>iversenii</i>	+	++	-	-	-	-	-	+++	+	-	-	+		Freire-Nordi <i>et al.</i> (2006)
	<i>orbiculare</i>	+	+	+	+	++	+	+	+++	+	-	nd	nd	Infos liaisons	Giroldo <i>et al.</i> (2005)
<i>Staurodesmus</i> (Cha)	<i>convergens</i>	+	+	+	+	++	+	+	+++	+	-	nd	nd		Gouvêa <i>et al.</i> (2002)
<i>Stauroneis</i> (Cha)	sp.	-	++	-	+	++	-	++	+	+++	-	nd	nd	GlcN	Jin <i>et al.</i> (2018)
	<i>orbiculare</i>	+	+	+	+	++	+	+	+++	+	-	nd	nd		Giroldo <i>et al.</i> (2005)
<i>Stichococcus</i> (Chl)	<i>Bacillaris</i> (772B, 747C)	+++	+	+	+	nd	nd	+	tr	++	-	tr	nd		Barberousse <i>et al.</i> (2006)
	<i>bacillaris</i> (774E, 677A)	+++	++	+	+	nd	nd	+	+	+	-	tr	nd		Barberousse <i>et al.</i> (2006)
<i>Tetmemorus</i> (Cha)	<i>brebissonii</i>	+	++	+	+	nd	nd	+	+++	+	tr	+	+	Infos liaisons	Kiemle <i>et al.</i> (2007)
	<i>pseudonana</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd		Ai <i>et al.</i> (2015)
<i>Thalassiosira</i> (Oc)	sp.	++	+	-	+	+	-	+++	+	+	nd	nd	+	GlcNAc, GalNAc, infos liaisons	Giroldo <i>et al.</i> (2003)

+++ : 1<sup>er</sup> monosaccharide, ++ : 2<sup>nd</sup> monosaccharide, + : présence, - : absence, tr : traces, nd : non déterminé, Cha : Charophyta, Chl : Chlorophyta, Mi : Miozoa, Oc : Ochrophyta, Rh : Rhodophyta

**Tableau 3, partie 6** : Caractérisations structurales des EPS de microalgues et de Cyanobactéries.

Genres	Espèces	Rha	Gal	Ara	Glc	GlcA	GalA	Man	Fuc	Xyl	Rib	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Protéines	Autres informations	Références	
<i>Anabaena</i>	<i>augstmalis</i>	tr	+	-	+++	-	++	+	+	-	-	nd	nd	GalN	Di Pippo <i>et al.</i> (2013)	
	<i>cylindrica</i>	tr	+	-	+++	+	-	+	+	++	-	nd	nd	Autre acide uronique	Lama <i>et al.</i> (1996)	
	<i>flos-aquae</i>	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	nd	nd		Moore & Tischer (1964)	
	sp.	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd		Moreno <i>et al.</i> (1998)	
	<i>spiroides</i>	++	+	nd	+	+++	-	+	+	+	+	nd	nd	nd	GlcNAc, GalNAc	Gouvêa <i>et al.</i> (2005)
	<i>sphaerica</i>	-	+++	tr	+	+	+	+	-	-	-	-	nd	nd		Nicolaus <i>et al.</i> (1999)
	<i>torulosa</i>	++	+	+	+	+	+	-	+	+++	-	nd	nd	GlcN	Nicolaus <i>et al.</i> (1999)	
<i>Anacystis</i>	<i>nidulans</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd		Sangar & Dugan (1972)	
<i>Aphanocapsa</i>	<i>halophytia</i>	+	+	-	++	-	-	+	+++	+	-	+	+		Sudo <i>et al.</i> (1995)	
<i>Aphanothece</i>	<i>halophytica</i>	-	+	+	+++	+	-	+	++	-	-	nd	nd	Infos liaisons	Li <i>et al.</i> (2001)	
<i>Arthrospira</i>	<i>maxima</i>	++	+	-	++	+	+	+	+	+++	-	nd	nd		Nie <i>et al.</i> (2002)	
	<i>platensis</i>	+	+++	tr	+	tr	+	tr	+	++	nd	tr	+		Trabelsi <i>et al.</i> (2009b)	
	<i>platensis</i>	+++	+	nd	+	++	++	tr	nd	+	nd	+	nd		Majdoub <i>et al.</i> (2009)	
	<i>platensis</i>	+++	+	+	+	+	+	-	-	++	nd	nd	nd		Depraetere <i>et al.</i> (2015)	
<i>Calothrix</i>	<i>pulvinata</i>	+	+	+	+++	nd	nd	+	+	+	-	tr	nd		Barberousse <i>et al.</i> (2006)	
	sp.	-	++	+	+++	tr	+	+	+	+	-	nd	nd	GlcN	Di Pippo <i>et al.</i> (2013)	
<i>Chlorogloeopsis</i>	sp.	+	+	+	++	+	+++	+	+	-	-	nd	nd		Nicolaus <i>et al.</i> (1999)	
<i>Chroococcus</i>	<i>minutus</i>	+	+	+	+++	+	tr	++	+	+	-	nd	+	GlcN et groupements méthyles	Fischer <i>et al.</i> (1997)	
<i>Chroococcus</i>	<i>submarinus</i>	+	+	+	++	+	+	+	++	+++	+	+	+	GlcN	Richert <i>et al.</i> (2005)	
<i>Cyanospira</i>	<i>capsulata</i>	-	-	+	+	-	+++	+	+	-	-	-	+		Vincenzini <i>et al.</i> (1993)	

+++ : 1<sup>er</sup> monosaccharide, ++ : 2<sup>nd</sup> monosaccharide, + : présence, - : absence, tr : traces, nd : non déterminé

**Tableau 3, partie 7** : Caractérisations structurales des EPS de microalgues et de Cyanobactéries.

Genres	Espèces	Rha	Gal	Ara	Glc	GlcA	GalA	Man	Fuc	Xyl	Rib	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Protéines	Autres informations	Références
<i>Cyanothece</i>	sp.	-	+	-	+++	+	+	++	+	+	-	-	tr		De Philippis <i>et al.</i> (1993)
	sp.	-	-	-	+++	-	-	-	-	++	+	+	+		Parikh & Madamwar (2006)
<i>Fischerella</i>	<i>muscolica</i>	-	+	-	+++	+	+	+	+	+	-	nd	nd		Nicolaus <i>et al.</i> (1999)
<i>Gloeocapsa</i>	<i>kuetzingiana</i>	++	+	+++	+++	+	++	nd	+	+++	+	nd	nd	GalN, traces de GlcN	Rossi <i>et al.</i> (2012)
	sp.	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd		Najdenski <i>et al.</i> (2013)
<i>Gloeocapsosis</i>	<i>crepidinum</i>	+	+	+	++	+	+	nd	+++	+	+	nd	nd	GlcN, GalN	Rossi <i>et al.</i> (2012)
<i>Gloeothece</i>	sp.	+	++	-	+++	nd	nd	+	-	+	-	+	+	Groupements méthyles	Tease <i>et al.</i> (1991)
<i>Johannesbaptistia</i>	<i>pellucida</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+		Richert <i>et al.</i> (2005)
	<i>foveolarum</i>	++	+	-	+++	nd	nd	+	-	+	-	nd	nd		Barberousse <i>et al.</i> (2006)
<i>Leptolyngbya</i>	<i>tenuis</i>	++	+	-	+++	nd	nd	+	+	+	-	tr	nd		Barberousse <i>et al.</i> (2006)
	sp.	+	tr	tr	+++	+	++	nd	+	+	+	nd	nd	GalN, traces de GlcN	Rossi <i>et al.</i> (2012)
<i>Lyngbya</i>	<i>conferviodes</i>	tr	++	tr	+++	+	nd	+	tr	tr	-	nd	nd		Gloaguen <i>et al.</i> (1995)
<i>Microcoleus</i>	<i>vaginatus</i>	+	++	+	+++	+	+	+	+	+	-	nd	+		Ge <i>et al.</i> (2014b)
		+	+	+	++	+	+	+++	+	+	+	-	nd	+	GlcNAc, infos liaisons
<i>Microcystis</i>	<i>aeruginosa</i>	++	+	nd	+	-	+	+	+	+++	nd	nd	nd	GlcNAc, GalNAc	Gouvêa <i>et al.</i> (2005)
	<i>aeruginosa</i>	+++	-	-	+	nd	nd	++	-	-	-	-	-		Forni <i>et al.</i> (1997)
	<i>aeruginosa flos-aquae</i>	-	-	-	+++	nd	nd	++	-	-	-	-	-		Forni <i>et al.</i> (1997)
	<i>viridis</i>	++	-	-	+++	nd	nd	+	+	-	-	nd	nd		Forni <i>et al.</i> (1997)

+++ : 1<sup>er</sup> monosaccharide, ++ : 2<sup>nd</sup> monosaccharide, + : présence, - : absence, tr : traces, nd : non déterminé

**Tableau 3, partie 8** : Caractérisations structurales des EPS de microalgues et de Cyanobactéries.

Genres	Espèces	Rha	Gal	Ara	Glc	GlcA	GalA	Man	Fuc	Xyl	Rib	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Protéines	Autres informations	Références	
<i>Nostoc</i>	<i>calcicola</i>	+	+	+	+++	+	+	+	+	++	-	nd	+		Flaibani <i>et al.</i> (1989)	
	<i>carneum</i>	-	-	-	-	-	-	+++	-	++	-	-	+		Parikh & Madamwar (2006)	
	<i>commune</i>		-	++	-	+++	-	nd	+	-	-	nd	nd	nd		Huang <i>et al.</i> (1998)
			-	+	-	+++	nd	nd	-	-	+	+	nd	nd	infos liaisons	Helm <i>et al.</i> (2000)
	<i>flagelliforme</i>	-	++	+	+	+	nd	Tr	+	+++	nd	nd	nd		Huang <i>et al.</i> (1998)	
	sp.	+	++	-	+++	+	+	+	-	+	-	nd	+		Ge <i>et al.</i> (2014a)	
	sp.	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	nd	nd		Moore & Tischer (1964)	
	<i>insulare</i>	-	-	++	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	tr	Traces d'acétate, infos liaisons	Volk <i>et al.</i> (2006)
	<i>insulare</i>	tr	tr	+	+++	++	+	+	+	+	tr	-	n.d.	+		Fischer <i>et al.</i> (1997)
	<i>muscoru</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd		Najdenski <i>et al.</i> (2013)
<i>entophytum</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd		Najdenski <i>et al.</i> (2013)	
sp.	+	+	+	+++	+	+	+	+	+	++	-	nd	nd		Di Pippo <i>et al.</i> (2013)	
<i>Oscillatoria</i>	<i>amphibia</i>	+	+	tr	+++	nd	nd	++	tr	+	-	nd	nd		Gloaguen <i>et al.</i> (1995)	
	<i>corallinae</i>	+	+	+	+++	+	nd	++	+	+	-	nd	nd		Gloaguen <i>et al.</i> (1995)	
	sp.	tr	-	-	+++	-	-	-	tr	tr	-	-	+	Autre acide uronique	Richert <i>et al.</i> (2005)	
	sp.	-	+	+	++	+	+++	-	+	+	-	nd	nd		Nicolaus <i>et al.</i> (1999)	
<i>Phormidium</i>	<i>autumnale</i>	+++	tr	-	+	-	+	+	tr	tr	+	nd	nd		Di Pippo <i>et al.</i> (2013)	
	<i>battersii</i>	-	++	+	+++	+	+	++	+	+	-	+	+		Richert <i>et al.</i> (2005)	
	<i>ambiguum</i>	+++	++	+	++	+	+	+	+	+	-	tr	nd		Barberousse <i>et al.</i> (2006)	

+++ : 1<sup>er</sup> monosaccharide, ++ : 2<sup>nd</sup> monosaccharide, + : présence, - : absence, tr : traces, nd : non déterminé

**Tableau 3, partie 9** : Caractérisations structurales des EPS de microalgues et de Cyanobactéries.

Genres	Espèces	Rha	Gal	Ara	Glc	GlcA	GalA	Man	Fuc	Xyl	Rib	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Protéines	Autres informations	Références
<i>Phormidium</i>	<i>corium</i> (442D, 746B)	++	+	+	+++	nd	nd	+	+	+	-	tr	nd		Barberousse <i>et al.</i> (2006)
	<i>corium</i> (444A)	+	+++	+	++	nd	nd	+	+	+	-	tr	nd		Barberousse <i>et al.</i> (2006)
	<i>corium</i> (674A)	++	+	-	+	nd	nd	+	-	+++	-	nd	nd		Barberousse <i>et al.</i> (2006)
	<i>corium</i> (743D)	+	+	-	+++	nd	nd	++	-	+	-	nd	nd		Barberousse <i>et al.</i> (2006)
	<i>ectocarpi</i> (K5)	+	++	tr	+++	+	nd	+	tr	+	-	nd	nd		Gloaguen <i>et al.</i> (1995)
	<i>ectocarpi</i> (ME3)	+	+	tr	+++	+	nd	++	tr	+	-	nd	nd		Gloaguen <i>et al.</i> (1995)
	<i>ectocarpi</i> (N182, C86)	-	+	-	+++	+	nd	++	-	+	-	nd	nd		Gloaguen <i>et al.</i> (1995)
	<i>foveolarum</i> (C52)	+	+	tr	+++	+	nd	++	tr	+	-	nd	nd		Gloaguen <i>et al.</i> (1995)
	<i>foveolarum</i> (MEU)	+	++	+	+++	-	-	+	+	+	-	nd	nd		Gloaguen <i>et al.</i> (1995)
	<i>minutum</i> (D5)	tr	+++	-	++	nd	nd	+	+	+	-	nd	nd		Gloaguen <i>et al.</i> (1995)
	<i>minutum</i> (NB5)	tr	+	+	+++	nd	nd	++	-	+	-	nd	nd		Gloaguen <i>et al.</i> (1995)
	<i>minutum</i> (RT6)	+	+	++	+++	+	nd	+	+	+	-	nd	nd		Gloaguen <i>et al.</i> (1995)
	sp. (CCAP1464/3, CCAP1463/4)	+	++	+	+++	+	nd	+	tr	+	-	nd	nd		Gloaguen <i>et al.</i> (1995)
	sp. (PNG91, 90-14/1)	+	+	+	+++	nd	nd	++	+	+	-	nd	nd		Gloaguen <i>et al.</i> (1995)
	sp.	+	+	+	+++	+	+	-	+	++	-	nd	nd		Nicolaus <i>et al.</i> (1999)
<i>tenuis</i>	+	+	+++	++	nd	tr	+	+	+	-	nd	+	GlcNAc, infos liaisons	Hu <i>et al.</i> (2003)	

+++ : 1<sup>er</sup> monosaccharide, ++ : 2<sup>nd</sup> monosaccharide, + : présence, - : absence, tr : traces, nd : non déterminé

**Tableau 3, partie 10** : Caractérisations structurales des EPS de microalgues et de Cyanobactéries.

Genres	Espèces	Rha	Gal	Ara	Glc	GlcA	GalA	Man	Fuc	Xyl	Rib	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Protéines	Autres informations	Références
	<i>usteri</i>	+	+++	+	++	nd	nd	+	+	+	-	tr	nd		Barberousse <i>et al.</i> (2006)
<i>Plectonema</i>	<i>golenkinianum</i>	-	-	-	+++	-	-	-	tr	tr	-	-	+		Richert <i>et al.</i> (2005)
	sp.	+	++	nd	+++	tr	+	nd	tr	+	+	nd	nd	GlcN, traces de GalN	Rossi <i>et al.</i> (2012)
<i>Rhabdoderma</i>	<i>rubrum</i>	-	+	-	+	tr	tr	+	+	++	-	+	+	GlcN +++	Richert <i>et al.</i> (2005)
<i>Scytonema</i>	<i>hofmanni</i>	-	+	-	+	+	+	+++	-	-	-	nd	nd		Nicolaus <i>et al.</i> (1999)
	<i>javanicum</i>	+	++	+	+++	tr	tr	+	tr	+	-	nd	+	Infos liaisons	Hu <i>et al.</i> (2003)
<i>Synechococcus</i>	sp.	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd		Phlips <i>et al.</i> (1989)
	<i>aquatilis</i>	+	+	-	+++	+	+	+	+	+	-	nd	nd	GlcN ++	Di Pippo <i>et al.</i> (2013)
<i>Synechocystis</i>	sp.	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd		Najdenski <i>et al.</i> (2013)
	sp. (PCC6803)	+	+	-	+++	+	+	+	++	+	-	+	+	GlcN, GalN	Panoff <i>et al.</i> (1988)
	sp. (PCC6714)	+	++	+	+++	+	+	++	+	+	-	+	+	GlcN, GalN	Panoff <i>et al.</i> (1988)
<i>Tolypothrix</i>	<i>tenuis</i>	+	+	+	+++	+	+	++	+	-	-	nd	nd	GlcN	Nicolaus <i>et al.</i> (1999)
<i>Trichormus</i>	<i>variabilis</i> (VRUC162)	tr	+	tr	+++	-	-	+	+	++	+	nd	nd	GalN	Di Pippo <i>et al.</i> (2013)
	<i>variabilis</i> (VRUC168)	+	+	+	+++	+	+	+	+	++	-	nd	nd	GlcN	

+++ : 1<sup>er</sup> monosaccharide, ++ : 2<sup>nd</sup> monosaccharide, + : présence, - : absence, tr : traces, nd : non déterminé



Six phyla sont concernés : Chlorophyta, Charophyta, Rhodophyta, Ochrophyta, Miozoa et les Cyanobactéries. Les genres les plus étudiés appartiennent aux familles des Chlamydomonadaceae, Glaucosphaeraceae, Porphyridiaceae Desmidiaceae et Chlorellaceae chez les microalgues, et Nostocaceae, Oscillatoriaceae et Microcoleaceae chez les Cyanobactéries. L'ensemble des données montre que les EPS des microalgues et Cyanobactéries sont tous des hétéropolymères très complexes. Leur composition varie entre 3 et 8 monosaccharides, excepté celui produit par *Gyrodinium impudicum* qui est un galactane sulfaté (Yim *et al.*, 2003). La plupart des études se limitent à la composition en monosaccharides et à la quantification des acides uroniques généralement réalisée avec un dosage colorimétrique (Filisetti-Cozzi & Carpita, 1991). Tous les oses neutres entrant habituellement dans la composition des PS sont retrouvés chez ces EPS, conduisant à des compositions très diversifiées notamment chez les microalgues. La plupart des oses peuvent être retrouvés comme monosaccharide majoritaire dans différents EPS, excepté l'Ara présent comme monosaccharide constitutif principal uniquement dans l'EPS de *Penium spirostriolatum* (Kiemle *et al.*, 2007). Les EPS des Cyanobactéries sont moins variées, le Glc occupant la place de 1<sup>er</sup> et 2<sup>ème</sup> monosaccharide majoritaire dans 51 et 12 compositions, respectivement.

Les acides uroniques sont également retrouvés dans bon nombre d'entre eux, parfois à des teneurs extrêmement élevées, comme chez *Netrium interruptum*, *Netrium oblongum* et *Phormidium corium* (674A) où ils représentent respectivement 28, 29 et 40 % de la composition globale des polymères (Kiemle *et al.*, 2007 ; Barberousse *et al.*, 2006). Le GlcA est le monosaccharide majoritaire des EPS de *Closterium* sp., *Amphora* sp., *Hyalotheca dissiliens* et *Anabaena spiroides* (Paulsen & Vieira, 1994 ; Domozych *et al.*, 1993 ; Gouvêa *et al.*, 2005 ; Jin *et al.*, 2018) et le GalA chez les EPS de *Chlorogloeopsis* sp., *Cyanospira capsulata* et *Oscillatoria* sp. (Nicolaus *et al.*, 1999 ; Vincenzini *et al.*, 1993). Par ailleurs, le ManA a été détecté uniquement chez l'EPS de *Heterosigma akashiwo* (Lopes *et al.*, 2012). Les EPS d'*Oscillatoria* sp. et *Anabaena cylindrica* possèdent également un acide uronique non identifié et différent de ceux cités jusqu'à présent (Richert *et al.*, 2005 ; Lama *et al.*, 1996).

Plus rare, et en teneur beaucoup plus faibles, les osamines (GlcN et GalN) et leurs dérivés acétylés (GlcNAc et GalNAc) ont également été détectés dans 23/165 (~14 %) compositions

d'EPS. Ils occupent la place de 1<sup>er</sup> et 2<sup>nd</sup> monosaccharide chez *Rhabdoderma rubrum* et *Synechocystis aquatilis*, respectivement (**Richert et al., 2005 ; Di Pippo et al., 2013**).

Les groupements non sucres tels que les sulfates et les protéines ne sont pas systématiquement analysés. Leur présence ou absence reste indéterminée dans 77 (~53 %) et 82 (~60 %) des compositions analysées, respectivement. Les EPS des Cyanobactéries *Rhabdoderma rubrum*, *Aphanocapsa halophytia*, *Phormidium battersii*, *Arthrospira platensis*, *Johannesbaptistia pellucida*, *Chroococcus submarinus*, *Nostoc* sp., *Microcoleus vaginatus* et *Gloeotheca* sp. présentent des taux élevés de sulfates (> 10 %) (**Tease et al., 1991 ; Richert et al., 2005 ; Ge et al., 2014a ; Ge et al., 2014b ; Majdoub et al., 2009**). Il en est de même pour les EPS des microalgues *Amphora* sp., *Gyrodinium impudicum*, *Cylindrotheca fusiformis*, *Porphyridium marinum*, *Porphyridium cruentum*, *Porphyridium aerugineum*, *Tetmemorus brebissonii* et *Pleurotaenium trabecula* (**Zhang et al., 2008a ; Percival & Foyle, 1979 ; Soanen et al., 2016 ; Kiemle et al., 2007 ; Yim et al., 2003 ; Magaletti et al., 2004**). Les protéines sont souvent présentes à des teneurs faibles, excepté pour les EPS de *Microcoleus vaginatus*, *Scytonema javanicum* et *Arthrospira platensis*, 50, 50 et 55 %, respectivement (**Hu et al., 2003 ; Majdoub et al., 2009**). Néanmoins, la méthode utilisée pour la purification des EPS a une forte influence sur la teneur en protéines observée. D'autres groupements non sucre tels que les méthyles et les acétyles ont également été identifiés. Les groupements méthyles sont présents dans 7 compositions et les groupements acétyles ont été identifiés uniquement chez l'EPS de la microalgue rouge *Flintiella sanguinaria* (**Gaignard et al., 2018**). Néanmoins, la présence de ces groupements est rarement recherchée et leur occurrence pourrait donc être plus fréquente. Enfin, du pyruvate a été mis en évidence dans les EPS de *Chlamydomonas reinhardtii*, *Amphora rostrata* et *Navicula subinflata* (**Khandeparker & Bhosle, 2001 ; Bafana, 2013 ; Bhosle et al., 1995**), et de l'acétate dans celui de *Nostoc insulare* (**Volk et al., 2006**).

Ces données indiquent que les compositions des EPS de microalgues et Cyanobactéries sont très complexes en comparaison de celles des polymères provenant des plantes supérieures, de champignons, d'animaux ou de bactéries non photosynthétiques. D'ailleurs, la plupart des études se limitent à étudier leur composition en monosaccharides et seules quelques-unes présentent des informations structurales (liaisons glycosidiques). A l'heure actuelle aucun travail n'a permis de rapporter la structure fine et complète d'un EPS de microalgue ou de

Cyanobactérie. L'absence d'unités de répétition et la présence régulière de substituants non sucre sont probablement les causes du peu d'informations structurales disponibles. Les données de la littérature concernant les EPS des microalgues présentent uniquement des informations sur la nature de certaines liaisons glycosidiques (Urbani *et al.*, 2012 ; Giroldo *et al.*, 2003, 2005 ; Hu *et al.*, 2003 ; Kiemle *et al.*, 2007 ; Domozych *et al.*, 1993 ; Vieira & Paulsen, 1994 ; Paulsen *et al.*, 1974 ; Percival *et al.*, 1980), ainsi que quelques structures d'oligosaccharides (Tableau 4). Des disaccharides très similaires d'EPS du genre *Porphyridium* ont été identifiés par Percival & Foyle (1979) et Geresh *et al.* (1990). Seule la forme du Galp varie (énantiomère de la série D ou L). Le Galp a été retrouvé chez *Porphyridium* sp. au sein d'un enchainement plus complexe : [2 ou 4)- $\beta$ -D-Xylp-(1,<sub>n</sub>3)- $\alpha$ -D-Glcp-(1,3)- $\alpha$ -D-GlcAp-(1,3)-L-Galp-(1 $\rightarrow$ .

**Tableau 4, partie 1** : Structures d'oligosaccharides provenant d'EPS de microalgues et Cyanobactéries.

Organismes	Structures	Références
<i>Chlamydomonas augustae</i>	$  \begin{array}{cccc}  \rightarrow 3 \text{ (ou 4) Glcp } 1 & \rightarrow 3 \text{ (ou 4) Glcp } 1 & \rightarrow 3 \text{ (ou 4) Glcp } 1 & \rightarrow 3 \text{ (ou 4) Glcp } 1 \rightarrow \\  4 \text{ (ou 3)} & 4 \text{ (ou 3)} & 4 \text{ (ou 3)} & 4 \text{ (ou 3)} \\  \uparrow & \uparrow & \uparrow & \uparrow \\  1 & 1 & 1 & 1 \\  \text{Araf} & \text{Araf} & \text{Araf} & \text{Arap} \\  2 & 2 & \text{(ou Galp (ou f))} & \text{(ou Galp (ou f))} \\  \uparrow & \uparrow & & \\  1 & 1 & & \\  \text{Galp} & \text{Galp} & & \\  \text{(ou Arap (ou f))} & \text{(ou Arap (ou f))} & &   \end{array}  $	Allard & Tazi (1992)
<i>Chlamydomonas corrosa</i>	$  \begin{array}{cccc}  & \text{Galp} & & \text{Galp} \\  & 1 & & 1 \\  & \downarrow & & \downarrow \\  & 2 & & 2 \\  \rightarrow 3 \text{ Ara } 1 & \rightarrow 3 \text{ Arap } 1 & \rightarrow 3 \text{ Ara } 1 & \rightarrow 3 \text{ Arap } 1 \rightarrow \\  5 \text{ (ou 4)} & 5 \text{ (ou 4)} & & \\  \uparrow & \uparrow & & \\  1 & 1 & & \\  \text{Galp} & \text{Galp} & & \\  3 & & & \\  \uparrow & & & \\  1 & & & \\  \text{Galp} & & &   \end{array}  $	Allard & Tazi (1992)

**Tableau 4, partie 2** : Structures d'oligosaccharides provenant d'EPS de microalgues et Cyanobactéries.

Organismes	Structures	Références
<i>Porphyridium cruentum</i> , <i>Porphyridium aerugineum</i>	D-GlcAp $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3 D-Galp 1	Percival & Foyle (1979)
<i>Porphyridium</i> sp., <i>Porphyridium cruentum</i> , <i>Porphyridium aerugineum</i> , <i>Rhodella reticulata</i>	D-GlcAp $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3 L-Galp 1	Geresh <i>et al.</i> (1990)
<i>Porphyridium</i> sp.	$\left[ \begin{array}{c} 2 \text{ (ou 4) D-Xylp } \beta 1 \rightarrow 3 \\ \phantom{2 \text{ (ou 4) D-Xylp } \beta 1 \rightarrow 3} \end{array} \right]_n \text{ D-Glcp } \alpha 1 \rightarrow 3 \text{ D-GlcAp } \alpha 1 \rightarrow 3 \text{ L-Galp } 1$	Geresh <i>et al.</i> (2009)
<i>Ankistrodesmus densus</i>	$\left[ \begin{array}{c} 2 \text{ (ou 4) D-Xylp } \beta 1 \rightarrow 2 \text{ (ou 4) D-Xylp } \beta 1 \\ 3 \text{ (ou 2 ou 4 ou 5)} \quad 3 \text{ (ou 2 ou 4 ou 5)} \end{array} \right]_n \rightarrow$ $\begin{array}{c} \uparrow \qquad \qquad \uparrow \\ 1 \qquad \qquad \qquad 1 \\ \text{Me}_{(3)}\text{-Galp} \qquad \text{Me}_{(3)}\text{-Galp} \\ \qquad \qquad \qquad \uparrow \\ \qquad \qquad \qquad 6 \\ \qquad \qquad \qquad \uparrow \\ \qquad \qquad \qquad 1 \\ \qquad \qquad \qquad \text{Me}_{(3)}\text{-Galp} \end{array}$	d'après Paulsen <i>et al.</i> (1998)

Tableau 4, partie 3 : Structures d'oligosaccharides provenant d'EPS de microalgues et Cyanobactéries.

Organismes	Structures	Références
<i>Cyanothece</i> sp.	$\left[ \begin{array}{c} 4 \text{ D-Idop-COO}^{-}_{(2)} \alpha 1 \rightarrow 4 \text{ Me}_{(2)}\text{-D-Glcp} \alpha 1 \\ \uparrow \\ \alpha 6 \\ \text{SO}_3^{-}_{(3)}\text{-D-Idop} \end{array} \right]_n \rightarrow$	Pereira <i>et al.</i> (2009) (adapté de Shah <i>et al.</i> (2000))
<i>Cyanospira capsulata</i>	$\left[ \begin{array}{c} 3 \text{ D-GlcNacp} \alpha 1 \rightarrow 3 \text{ D-GalAp} \alpha 1 \rightarrow 3 \text{ L-Fucp} \alpha 1 \\ \uparrow \qquad \qquad \uparrow \qquad \qquad \uparrow \\ \alpha 1 \qquad \qquad \alpha 1 \qquad \qquad \beta 1 \\ \text{L-Arap} \qquad \text{D-GalAp} \qquad \text{D-Glcp} \\ \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \uparrow \\ \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \beta 1 \\ \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \text{D-Manp} \\ \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \uparrow \\ \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \beta 1 \\ \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \text{(S)-CH}_3\text{CH-4-D-Manp} \\ \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad   \\ \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \text{CO}_2\text{H} \end{array} \right]_n \rightarrow$	Garozzo <i>et al.</i> (1998)

**Tableau 4, partie 4** : Structures d'oligosaccharides provenant d'EPS de microalgues et Cyanobactéries.

Organismes	Structures	Références
<i>Nostoc commune</i>	$  \begin{array}{c}  \text{NosA} \\  \beta 1 \\  \downarrow \\  \left[ \begin{array}{c} 6 \\ 4 \text{ D-Glcp } \beta 1 \rightarrow 4 \text{ D-Galp } \alpha 1 \rightarrow 4 \text{ D-Glcp } \beta 1 \rightarrow 4 \text{ D-Xylp } \beta 1 \end{array} \right]_n \\  \begin{array}{c} \uparrow \\ \alpha 1 \\ \text{L-Ribf} \end{array}  \end{array}  $	Helm <i>et al.</i> (2000)
<i>Nostoc insulare</i>	$  \begin{array}{c}  \left[ 1 \text{ Glcp } 1 \rightarrow 3 \text{ Glcp } 1 \rightarrow 4 \text{ GlcAp } 1 \rightarrow 4 \right]_n \\  \begin{array}{c} \uparrow \\ 1 \\ \text{Me}_{(3)}\text{-Araf} \end{array}  \end{array}  $	Volk <i>et al.</i> (2006)

De plus, la chaîne principale des EPS de microalgues est souvent ramifiée comme le montrent les études menées sur les EPS de *Chlamydomonas agustae*, *Chlamydomonas corrosa* et *Ankistrodesmus densus* (Paulsen *et al.*, 1998 ; Allard & Tazi, 1992). Davantage d'informations existent sur la production d'EPS par les Cyanobactéries mais elles se limitent aussi aux liaisons glycosidiques (Hu *et al.*, 2003 ; Li *et al.*, 2001), et seulement quelques structures détaillées sont disponibles (Pereira *et al.*, 2009 ; Tableau 4). Elles concernent *Cyanothece* sp., *Cyanospira capsulata*, *Nostoc commune* et *Nostoc insulare*. Tout comme les microalgues, le nombre important de monosaccharides différents et la variété des liaisons glycosidiques possibles conduisent à des structures complexes, avec un squelette principal souvent ramifié comme dans le cas des EPS de *Nostoc commune*, *Nostoc insulare* et *Cyanospira capsulata* (Helm *et al.*, 2000 ; Volk *et al.*, 2006 ; Garozzo *et al.*, 1998).

#### 3.4.2.3.1 Paramètres affectant la production d'exopolysaccharides

La limitation en nutriments est la stratégie la plus courante pour induire l'accumulation de composés d'intérêt et/ou de métabolites secondaires, telles que les pigments, les AGPI et les EPS. Les principaux inconvénients de cette stratégie sont un faible taux de croissance et un possible déclin de la biomasse (Gonzalez-Fernández & Ballestros, 2012). Un compromis entre croissance cellulaire et production de molécules cibles est donc nécessaire. Habituellement, la production de composés d'intérêts s'effectue en deux étapes successives. La première consiste à privilégier la croissance cellulaire en utilisant un milieu enrichi en nutriments et une stratégie de culture en batch. La seconde consiste à maximiser la production des molécules cibles lorsque les conditions de carences sont remplies (entrée en phase stationnaire). Récemment, Soanen *et al.* (2016) a proposé un mode de fonctionnement en semi-continu, permettant d'obtenir à la fois des concentrations en biomasse et en EPS élevées pour la microalgue rouge *Porphyridium marinum*. Cette stratégie est applicable que pour les espèces qui présentent une augmentation significative de la production d'EPS lorsqu'elles sont en état de carence nutritive, autrement dit en phase stationnaire. Cela correspond à la majorité des microalgues et Cyanobactéries, *e.g.* *Porphyridium aerugineum*, *Porphyridium marinum* (Ramus, 1972 ; Soanen *et al.*, 2016), *Anabaena* sp. (Moreno *et al.*, 1998), *Cyanothece* sp. (Reddy *et al.*, 1996), *Rhodella violacea*, *Rhodella reticulata* (Arad *et al.*, 1992 ; Villay *et al.*, 2013) et *Flintiella sanguinaria* (Gaignard *et al.*, 2018). Un comportement similaire est adopté par *Nostoc calcicola* (Flaibani *et al.*, 1989) et



*Phormidium* (Fattom & Shilo, 1984, 1985). Dans d'autres cas, une condition de limitation en azote suffit à induire la synthèse d'EPS comme démontré chez plusieurs espèces de *Cyanothece* par De Philippis *et al.* (1993, 1998). Pour ces souches, une stratégie de culture en continu est alors envisageable.

Dans d'autres cas la production d'EPS peut être observée tout au long de la phase de croissance puis être améliorée lors de l'entrée en phase stationnaire chez certaines souches, *e.g.* les Cyanobactéries *Aphanocapsa halophytica* (Sudo *et al.*, 1995), *Cyanospira capsulata* (Vincenzini *et al.*, 1990), *Nostoc insulare* (Volk *et al.*, 2006), *Chroococcus minutus* (Fischer *et al.*, 1997), *Anacystis nidulans* (Sangar & Dugan, 1972), *Synechocystis* (Panoff *et al.*, 1988), *Anabaena flos-aquae* (Moore & Tischer, 1964), *Anabaena cylindrical* (Lama *et al.*, 1996) et *Synechococcus* sp. (Philips *et al.*, 1989), et chez les microalgues *Botryococcus braunii* (Lupi *et al.*, 1994 ; Fernández *et al.*, 1989) et *Heterosigma akashiwo* (Lopes *et al.*, 2012). La production est même plus importante lors de la phase exponentielle chez *Chaetoceros affinis* par rapport à la phase stationnaire (Myklestad *et al.*, 1989).

#### 3.4.2.3.1.1 Eléments chimiques C, N, P, S et micronutriments

La production d'EPS peut être induite par la carence et/ou la limitation en azote disponible dans le milieu, comme le montrent de nombreuses études menées sur différents microorganismes tels que les Cyanobactéries *Anabaena* sp. (Moreno *et al.*, 1998), *Anacystis nidulans* (Sangar & Dugan, 1972), *Cyanothece* (De Philippis *et al.*, 1993, 1998), *Spirulina* sp. (Nicolaus *et al.*, 1999), mais aussi les microalgues rouges des genres *Rhodella* (Arad *et al.*, 1992 ; Villay *et al.*, 2013) et *Porphyridium* (Ramus, 1972 ; Soanen *et al.*, 2016), ainsi que les diatomées *Thalassiosira Pseudonana* (Ai *et al.*, 2015) et *Cylindrotheca closterium* (Underwood *et al.*, 2004). Néanmoins, cette même limitation en azote n'a pas d'effet sur la production d'EPS chez *Synechocystis* (Panoff *et al.*, 1988).

La nature de la source d'azote peut aussi affecter la production d'EPS. Lupi *et al.* (1994) ont comparé la production d'EPS par *Botryococcus braunii* avec différentes sources d'azote : nitrates, ammonium et urée. Les résultats ont montré que la production d'EPS a lieu indépendamment de la source d'azote mais avec des productivités variables après 14 jours de culture (2,4 g.L<sup>-1</sup> pour les nitrates, 2,1 g.L<sup>-1</sup> pour l'ammonium et 1,8 g.L<sup>-1</sup> pour l'urée), et ce pour

une concentration en biomasse finale similaire (1,1-1,2 g.L<sup>-1</sup>). L'impact de la source d'azote sur la production d'EPS dépend de la souche étudiée. En effet, celle-ci est altérée pour *Anabaena cylindrica* (Lama *et al.*, 1996) alors qu'elle est similaire pour *Anabaena flos-aquae* cultivée en présence de Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, KNO<sub>3</sub>, NaNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> ou NH<sub>4</sub>Cl (Tischer & Davis, 1971). Chez la Cyanobactérie diazotrophique *Anabaena* sp., l'apport d'azote sous forme N<sub>2</sub> dans le milieu de culture entraîne une augmentation significative de la production d'EPS par rapport aux sources KNO<sub>3</sub> et NH<sub>4</sub>Cl (17,2 et 2,7 g.L<sup>-1</sup>, respectivement (Moreno *et al.*, 1998). Cela n'est pas le cas chez *Nostoc* sp. (Otero & Vincenzini, 2004).

De nombreuses études montrent que la supplémentation en CO<sub>2</sub> durant la culture affecte la croissance et la production de divers métabolites par les microalgues et les Cyanobactéries, incluant les EPS. Par exemple, une absence de supplémentation en air dans la culture entraîne une diminution de la production en EPS chez *Phormidium* sp. et *Anabaena torulosa* (9 mg.L<sup>-1</sup> au lieu de 22 et 56 mg.L<sup>-1</sup>, respectivement) (Nicolaus *et al.*, 1999). Les travaux d'Iqbal & Zafar (1993) sur des souches de *Porphyridium* ont conduit à la production de 0,7 et 1,4 g.L<sup>-1</sup> d'EPS dans les cultures supplémentées par air ou CO<sub>2</sub> à 2,5 %. L'impact du ratio N/P sur la production de biomasse et des PS totaux a aussi été étudié chez *Porphyridium cruentum*. Des ratios N/P compris entre 35 et 50, conduisant à une limitation en phosphate ont amélioré la production de biomasse, tandis qu'un ratio N/P < 4,9, entraînant à une limitation en azote a amélioré d'un facteur 2 la production de PS (Razaghi *et al.*, 2014).

D'autres carences nutritives (phosphore et soufre) induisent chez certaines espèces la production d'EPS. La réduction de la concentration en phosphore inorganique dans le milieu de culture entraîne une production d'EPS chez les diatomées *Cylindrotheca closterium* (Underwood *et al.*, 2004 ; Urbani *et al.*, 2005), *Thalassiosira pseudonana* (Urbani *et al.*, 2005), *Chaetoceros affinis* (Myklestad *et al.*, 1972), *Cylindrotheca fusiformis* (Magaletti *et al.*, 2004), ainsi que chez les Cyanobactéries *Spirulina* sp. (Nicolaus *et al.*, 1999) et *Cyanothece* (De Philippis *et al.*, 1993). A l'inverse, la limitation en phosphore n'a aucun effet sur la production d'EPS de *Phormidium* (Nicolaus *et al.*, 1999) et *Anabaena torulosa* (Nicolaus *et al.*, 1999), et peut même être réduite pour *Anabaena cylindrica* (Lama *et al.*, 1996). De plus, il a été démontré que le degré de sulfatation des polymères produits par *Rhodella reticulata* était diminué de moitié en cas de limitation en soufre dans le milieu (Arad, 1988 ; Arad *et al.*, 1992). Enfin, le degré de

sulfatation de l'EPS de *Porphyridium cruentum* était augmenté avec une concentration en  $\text{MgSO}_4$  de 104 mM au lieu de 21 mM (de **Jesus Raposo et al., 2014**).

Les microéléments peuvent aussi avoir un rôle dans la production d'EPS. En effet, cette dernière est améliorée en situation de carence de calcium chez *Phormidium* (**Fattom & Shilo, 1984**). Chez *Cyanospira capsulata*, une augmentation de la production d'EPS de 17 % a été observée en état de carence en  $\text{Mg}^{2+}$  ou  $\text{Ca}^{2+}$  (**De Philippis et al., 1991**). A l'inverse, la productivité est plus faible chez *Cyanothece* en cas de carence en  $\text{Ca}^{2+}$  (379  $\text{mg.L}^{-1}$ ) ou  $\text{Mg}^{2+}$  (238  $\text{mg.L}^{-1}$ ) par rapport au contrôle (500  $\text{mg.L}^{-1}$ ) (**De Philippis et al., 1993**).

Outre l'activation et/ou l'amélioration de la productivité en EPS, la carence nutritive peut aussi affecter la composition en monosaccharides comme observé chez les diatomées. Le Glc est le monosaccharide principal des EPS de *Cylindrotheca closterium*, *Thalassiosira pseudonana* et *Skeletonema costatum* durant la phase exponentielle de croissance dans un milieu riche (**Urbani et al., 2005**). Sa teneur diminue de moitié chez *Cylindrotheca closterium* durant la phase exponentielle de croissance (7 jours de croissance) lorsque le phosphate est moins présent dans le milieu de culture, représentant respectivement 80 et 40 % de la composition (**Urbani et al., 2005**). En parallèle, les teneurs en Gal, Man et Xyl augmentent de près de 5, 20 et 10 %, respectivement. A l'inverse, la teneur en Glc de l'EPS de *Thalassiosira pseudonana* augmente significativement lorsque la souche est cultivée dans un milieu déficient en P après 21 jours de culture, représentant près de 90 % de la composition totale, contre seulement 20 % dans un milieu non déficient en P (**Urbani et al., 2005**). En parallèle, les teneurs de tous les autres monosaccharides (Gal, Man, Xyl, Rha et Fuc) diminuent. Par exemple, la teneur en Fuc passe de 30 à 5 %. L'évolution de la composition de l'EPS de *Skeletonema costatum* suit celle de *Thalassiosira pseudonana* mais dans des proportions bien moindres. En effet, la teneur en Glc passe d'environ 30 à 60 %, et les teneurs des autres monosaccharides sont légèrement plus faibles (~10 % pour le Man et 5 % pour le Gal et Rha) ou stables pour le Fuc (**Urbani et al., 2005**). Une analyse de la composition en monosaccharides de l'EPS de *Cylindrotheca fusiformis* a montré que la limitation en N conduit à une diminution spécifique du contenu en Gal, Man et Xyl et une augmentation des taux de Fuc et Rha (**Magaletti et al., 2004**). Dans des conditions de limitation en P, les pourcentages de Glc et Man diminuent, mais ceux du Rha et Gal augmentent, ainsi que la teneur en acides uroniques (~25 %). De plus, le taux de sulfates diminue de près de 40 et 75 %

dans des conditions de limitations en P et N, respectivement (**Magaletti et al., 2004**). Lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu riche, *Cylindrotheca closterium*, *Navicula perminata* et *Amphora exigua* produisent un EPS complexe contenant du Rha, Fuc, Xyl, Man, Gal, Glc et des acides uroniques. Dans des conditions de carence nutritive, les cellules produisent également un EPS composé de Man, Gal, Glc et d'acides uroniques (**Shnyukova & Zolotareva, 2015**).

Enfin, l'impact des différents modes de culture (photoautotrophe, hétérotrophe et mixotrophe) a été étudié sur la production de lipides, pigments et EPS par la microalgue verte *Chlorella* sp. Les résultats ont montré que la meilleure production de biomasse et d'EPS (1,14 g.L<sup>-1</sup>) était atteinte en mixotrophie (**Cheirsilp et al., 2016**). Le résultat le plus intéressant est la production d'EPS jusqu'à 5 g.L<sup>-1</sup> par *Neochloris oleoabundans* en condition mixotrophe avec du lactose comme source de carbone, alors qu'aucune production n'est observée dans des conditions photoautotrophes et hétérotrophes (glucose et lactose), ou bien en mixotrophie avec du glucose comme substrat organique (**Wu et al., 2011**).

En dehors de ces éléments, d'autres alternatives existent pour induire la production d'EPS par les microalgues et les Cyanobactéries. Elles sont basées sur les paramètres environnementaux tels que la salinité, l'irradiance et la température du milieu de culture.

#### **3.4.2.3.1.2 La salinité (NaCl)**

La production d'EPS par *Dunaliella salina* augmente avec la concentration en NaCl dans le milieu. A une concentration en NaCl de 5 M, la production est 17 fois plus importante qu'à 0,5 M (944 mg.L<sup>-1</sup> et 56 mg.L<sup>-1</sup>, respectivement) (**Mishra & Jha, 2009**). Un phénomène similaire a été observé chez *Microcoleus vaginatus* (**Chen et al., 2006 ; Hu et al., 2003**), *Scytonema javanicum*, *Phormidium tenue*, *Nostoc* sp. et *Desmococcus olivaceus* (**Hu et al., 2003**), *Spirulina* sp. (**Nicolaus et al., 1999**), et *Synechocystis* sp. (BASO444, BASO511 et BASO507) (**Ozturk & Aslim, 2010**). Un phénomène inverse a été observé chez *Aphanocapsa halophyta* puisque la synthèse d'EPS est fortement réduite au-delà de 4 % de NaCl, et est nulle à partir de 10 % (**Sudo et al., 1995**). *Anabaena* sp. voit sa production en EPS diminuer de 13,5 à 9,2 et 3,9 g.L<sup>-1</sup> pour des concentrations en NaCl de 0,85 et 510 mM, respectivement (**Moreno et al., 1998**). Il en est de même chez *Cyanothece* sp. pour des concentrations en NaCl jusqu'à 2 M (**De Philippis et al., 1993**). L'impact de la salinité sur la synthèse d'EPS est donc, une fois de

plus, souche dépendante puisqu'une augmentation de la concentration en NaCl jusqu'à 0,5 M n'améliore pas la production d'EPS chez *Synechocystis* (Panoff *et al.*, 1988). *Nitzschia frustulum* semble réagir différemment. Des variations de production d'EPS ont été observées pour différentes concentration en NaCl, sans que la croissance cellulaire ne soit impactée. Cependant, aucune relation linéaire entre la quantité d'EPS produite et la concentration en NaCl n'a pu être établie (Allan *et al.*, 1972). Néanmoins, les teneurs en Man, Gal et Fuc du PS ont diminué d'un facteur 3, 4 et 6 respectivement, lorsque la teneur en NaCl dans le milieu passait de 1,3 à 20,8 g.L<sup>-1</sup>. A l'inverse, les teneurs en Rha et Xyl ont augmentées d'un facteur 2 et 7.

#### 3.4.2.3.1.3 L'irradiance

Habituellement, la production d'EPS est améliorée par un approvisionnement continu de lumière (Lupi *et al.*, 1994) et de fortes irradiances (Moreno *et al.*, 1998). Ainsi, *Arthrospira platensis* multiplie d'un facteur 2 sa production d'EPS lorsqu'elle est cultivée à 35 °C sous 180 au lieu de 50  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (Trabelsi *et al.*, 2009a). La meilleure productivité en EPS par *Porphyridium* sp. est obtenue avec un apport de lumière journalier de 90 % (90 % du temps à la lumière et 10 % à l'obscurité) pour une irradiance de 150  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , et 95 % pour une irradiance de 300  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (Merchuk *et al.*, 1998). L'effet des conditions d'irradiance a été étudié chez *Rhodella violacea* (Villay *et al.*, 2013). La meilleure production d'EPS a été trouvée pour une irradiance de saturation, juste avant celle induisant la photoinhibition. Dans certains cas, la qualité du spectre lumineux affecte la production d'EPS. Ainsi, les lumières rouge (600-700 nm) et bleue (400-500 nm) augmentent la production d'EPS chez *Porphyridium cruentum* par rapport à un mélange de lumières bleue/blanche (You & Barnett, 2004).

#### 3.4.2.3.1.4 La température

*Nostoc* sp. produit davantage d'EPS lorsqu'elle est cultivée à 30 °C plutôt que 35 °C en présence d'ions NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Otero & Vincenzini, 2004). Ce phénomène n'est pas observé lorsque le N<sub>2</sub> est l'unique source d'azote. Il faut néanmoins être prudent avec ce résultat car la croissance de la souche est meilleure à 30 °C, ce qui peut expliquer la meilleure productivité en EPS. La quantité d'EPS produite par *Botryococcus braunii* a été observée comme maximale à 28 °C. Celle-ci diminuait lorsque la température était plus basse (20-23 °C) ou plus haute (32 °C) et était

nulle à 33 °C (**Lupi et al., 1991**). L'absence de production d'EPS à 33 °C peut être expliquée par une inhibition de la croissance. En revanche, la productivité en biomasse étant similaire à 20, 23 et 28 °C, il est possible de conclure à un impact de la température sur la production d'EPS chez cette souche. Une augmentation de la production d'EPS d'un facteur 5 a aussi été observée pour *Anabaena* sp. lorsque la température de culture passe de 30-35 °C à 40-45 °C (**Moreno et al., 1998**).

#### **3.4.2.3.2 Procédés d'extraction et de purification**

Cette partie ne traite que des procédés employés pour l'extraction et la purification des EPS de microalgues et de Cyanobactéries (les méthodes d'extraction des BPS ne sont pas évoquées).

Les PS solubles du milieu de culture sont extraits par centrifugation ou *via* des systèmes de filtration membranaire afin de les séparer des cellules (**Zhang & Santschi, 2009 ; Li et al., 2011b ; Ye et al., 2005 ; Zhang et al., 2008a**). Dans un second temps, les EPS sont purifiés notamment en vue de leur caractérisation structurale. L'objectif de cette étape est de supprimer tous les composants non sucre tels que les protéines, les pigments et les sels non éliminer précédemment *via* des traitements à l'acide trichloroacétique, l'ultrafiltration tangentielle ou la précipitation alcoolique sélective (**Li et al., 2011b ; Marcati et al., 2014 ; Moore & Tischer, 1964 ; Patel et al., 2013**).

La fraction soluble issue des procédés d'extraction et contenant le PS (surnageant ou filtrat suivant la méthode d'extraction utilisée) peut être précipitée par des alcools de polarités variables tels que le méthanol, l'éthanol ou l'isopropanol (2 à 3 volumes d'alcool pour 1 volume de fraction soluble) (**Moreno et al., 1998 ; Lupi et al., 1991 ; Liu et al., 2015 ; Moore & Tischer, 1964 ; Patel et al., 2013**). Cependant, la précipitation alcoolique n'est pas une méthode de purification très appropriée pour les EPS de microalgues et Cyanobactéries car ils sont souvent contaminés par la co-précipitation des sels issus du milieu de culture. Dans ce cas, l'ultrafiltration tangentielle et la dialyse sont utilisées comme des alternatives à la précipitation alcoolique. Une étude comparative entre les techniques de précipitation alcoolique, la dialyse et l'ultrafiltration tangentielle a été menée par **Patel et al. (2013)**. Les résultats montrent que l'ultrafiltration tangentielle avec une membrane de polyethersulfone de 300 kDa a été la méthode de purification

la plus efficace. La même conclusion a été trouvée par **Zhang & Santschi (2009)**. Ces auteurs ont comparé 3 techniques de concentrations/précipitations (précipitation à l'éthanol, diafiltration en cellule Amicon et ultrafiltration tangentielle) dans le but de récupérer l'EPS produit par la diatomée *Amphora* sp. Les résultats montrent que les techniques de filtration sont les plus efficaces pour isoler l'EPS des milieux de culture riches en sels. D'autres auteurs ont utilisé la filtration tangentielle (avec une membrane de 10 kDa NMWCO) pour concentrer les EPS de *Nostoc commune* et éliminer les sels du milieu, avant une étape de précipitation alcoolique (**Helm et al., 2000**). Par ailleurs, un procédé à deux membranes (0,1 m<sup>2</sup> de membranes en polyethersulfone ayant un seuil de coupure de 300 et 10 kDa, respectivement) a été développé par **Marcati et al. (2014)** pour séparer efficacement le polymère et la B-PE de *Porphyridium*.

De nombreux auteurs décrivent les inconvénients liés à l'utilisation de l'ultrafiltration tangentielle comme moyen d'extraction et de purification des PS. Parmi eux, le phénomène de colmatage des membranes lié à la viscosité des EPS est le plus fréquent (**Rickman et al., 2012 ; Ye et al., 2005 ; Zhang et al., 2008b**). De plus, une grande quantité d'eau est nécessaire pour isoler, purifier et concentrer les EPS par ultrafiltration (**Li et al., 2011b**). Cependant, au vu des dernières avancées en matière de procédés de séparation membranaire, la nanofiltration pourrait être utilisée pour extraire et purifier les EPS de microalgues et Cyanobactéries. **Jhaveri & Murthy (2016)** ont en effet récemment publié une revue sur le développement de membranes nanocomposites pour lutter contre l'encrassement. Comme indiqué par les auteurs, de nombreuses membranes nanocomposites composées de nanoparticules sur membrane polymère (SiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, etc.) ont été fabriquées pour améliorer les propriétés d'anti-encrassement, d'hydrophobicité et d'auto-nettoyage.

A l'heure actuelle, l'extraction industrielle à grande échelle la moins coûteuse reste sans nul doute la précipitation alcoolique, les solvants pouvant facilement être régénérés par distillation. Cependant, le développement des procédés à membrane est une bonne alternative pour le dessalage et la concentration des solutions d'EPS, même si elle constitue une étape très limitée en raison des viscosités élevées des solutions de PS et du coût élevé des membranes.

### 3.4.2.3.3 Les voies de valorisations des exopolysaccharides

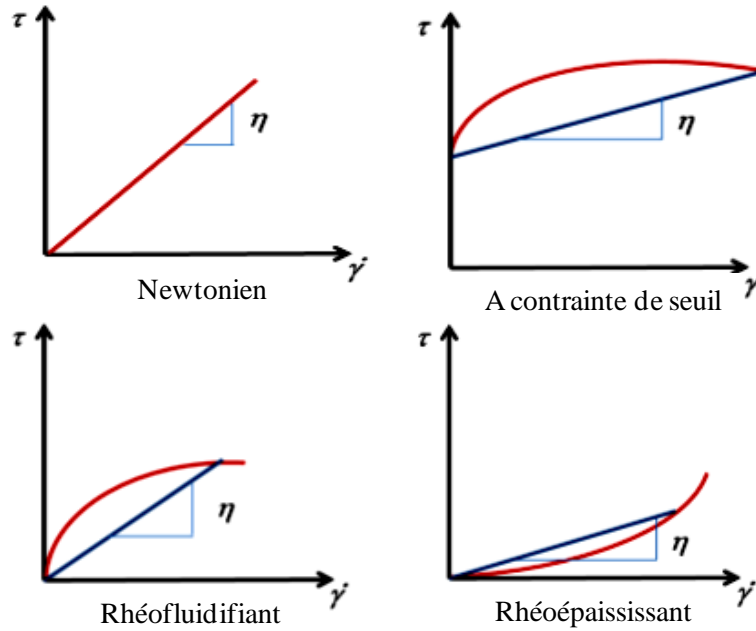
#### 3.4.2.3.3.1 Les propriétés rhéologiques

Les PS sont couramment utilisés comme épaississants, stabilisants et gélifiants dans les industries agroalimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques (Funami, 2017). La viscosité des polymères en solution est directement liée à des propriétés moléculaires fondamentales comme la conformation moléculaire, la masse molaire, la distribution en masse mais aussi la concentration. L'étude en régime dilué des polymères en solution permet notamment d'accéder à leur viscosité intrinsèque. On peut également accéder, avec la chromatographie d'exclusion stérique, couplée à des techniques de diffusion de la lumière (CES/DLMA), à des constantes de masses molaires en masse et en nombre ( $M_w$  et  $M_n$ ), aux rayons hydrodynamique ( $R_h$ ) et de giration ( $R_g$ ), à l'indice de polydispersité ( $I_p$ ), etc. La viscosité apparente permet de définir le comportement rhéologique d'un PS en solution en régime semi-dilué. Celle-ci peut varier avec le taux de cisaillement auquel la solution est soumise.

L'évolution de la viscosité apparente avec le taux de cisaillement peut être représentée par des comportements types qui permettent de distinguer quatre catégories de fluide (Figure 31) :

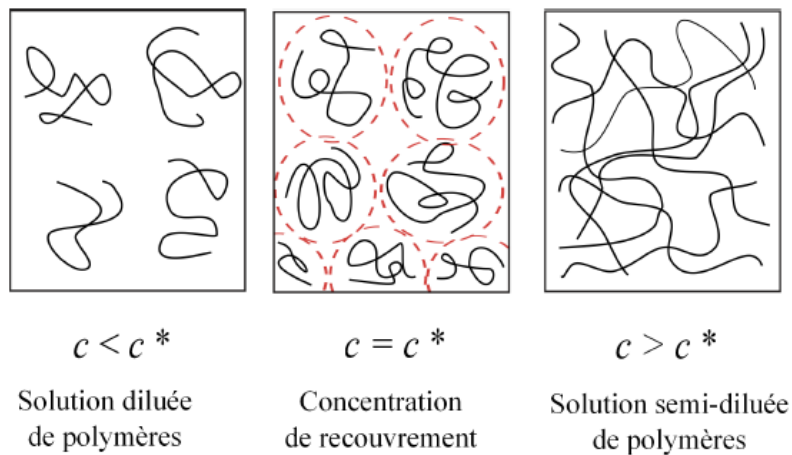
- les fluides newtoniens dont la viscosité est indépendante du taux de cisaillement,
- les fluides à contrainte de seuil où le seuil représente la limite d'énergie qu'il faut franchir afin que l'écoulement ait lieu,
- les fluides rhéofluidifiants dont la viscosité diminue avec l'augmentation du taux de cisaillement,
- les fluides rhéoépaississants dont la viscosité augmente avec l'augmentation du taux de cisaillement.





**Figure 31** : Régimes d'écoulement des fluides.  $\tau$  : contrainte.  $\dot{\gamma}$  : taux de cisaillement.

L'étude rhéologique des solutions de PS permet aussi de déterminer leur concentration critique de recouvrement ( $C^*$ ), c'est-à-dire la concentration de transition entre le régime dilué et semi-dilué (**Figure 32**). Quand  $C^*$  est atteint, des enchevêtrements de PS entrent en jeu. Cela se traduit par une augmentation de la viscosité de la solution. Néanmoins, certains EPS (associatifs et/ou à contrainte de seuil) ne possèdent pas de  $C^*$ .



**Figure 32** : Comportement d'une solution de polymère en fonction de la concentration.

Les EPS de *Porphyridium* sp. et *Rhodella reticulata* rendent des solutions aqueuses visqueuses à faible concentration (0,25 %, m/v). Ces polymères sont anioniques par leur contenu en acides uroniques (~10 %) et sont substitués par des groupements sulfates (~7 %). La viscosité des solutions est comprise entre 23,5 et 27,5 cP pour le polysaccharide de *Porphyridium* sp. et égale à 28,7 cP pour le polymère de *Rhodella reticulata* (Geresh *et al.*, 2002).

Diverses études ont été menées sur les propriétés d'écoulement en solution de polymères provenant de microalgues et Cyanobactéries (De Philippis *et al.*, 1998 ; de Jesus Raposo *et al.*, 2014, 2015). Par exemple, les solutions de PS produits par les microalgues rouges telles que *Porphyridium* et *Rhodella* présentent un comportement non newtonien (Geresh & Arad, 1991) puisque la viscosité diminue avec l'augmentation de la contrainte de cisaillement (fluide de type rhéofluidifiant) (Eteshola *et al.*, 1998). Des résultats similaires ont été obtenus avec des solutions d'EPS de *Porphyridium cruentum*. De plus, la viscosité mesurée avec les contraintes de cisaillement les plus faibles était significativement plus élevée lorsque l'EPS était issu de cultures contenant des concentrations en MgSO<sub>4</sub> ou MgCl<sub>2</sub> égales à 21 mM (de Jesus Raposo *et al.*, 2014). Cette diminution de la viscosité avec l'application de taux de cisaillement plus élevés a été suggérée comme étant liée à la dissociation des liaisons hydrogène fortes existantes entre les chaînes constitutives du PS (de Jesus Raposo *et al.*, 2013).

Les EPS des Cyanobactéries possèdent également des propriétés rhéologiques. Par exemple, la production continue du polymère de *Cyanospira capsulata* induit une augmentation de la viscosité dans la culture. Après 31 jours de culture en batch (0,0065 m<sup>3</sup>), la viscosité a été mesurée autour de 450-500 cP (Vincenzini *et al.*, 1990). Les données viscosimétriques, obtenues sur les surnageants prélevés à différents moments de la culture, ont révélé un comportement pseudoplastique (Vincenzini *et al.*, 1990). Une augmentation de la viscosité du milieu a aussi été observée lors de la culture de *Synechococcus* sp. La viscosité était principalement due aux EPS, puisque les résultats des mesures étaient similaires pour des solutions avec ou sans cellules (Phlips *et al.*, 1989). L'étude rhéologique a montré que la viscosité diminuait lorsque le taux de cisaillement augmentait, traduisant un comportement de type rhéofluidifiant. Enfin, *Anabaena* sp. (ATCC33047) produit également un polymère présentant des propriétés en solutions typiques des fluides pseudoplastiques, à des concentrations faibles de 0,6 % (w/w) (Moreno *et al.*, 2000). Des résultats similaires ont été obtenus sur plusieurs EPS isolés de *Cyanothece* mais à plus faible

concentration (0,1 %, w/w) (De Philippis *et al.*, 1998). L'analyse de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement, en comparaison avec la gomme xanthane, a permis de classer ces EPS en quatre groupes : ceux ayant un comportement similaire à la gomme xanthane, mais avec des valeurs de viscosité constamment supérieures (groupe 1) ou inférieures (groupe 2), ceux ayant un comportement similaire à la gomme xanthane mais avec des valeurs de viscosités plus importantes pour un faible taux de cisaillement, et plus faibles pour un taux de cisaillement élevé (groupe 3) et ceux ayant des valeurs de viscosité très basses quel que soit le taux de cisaillement (groupe 4) (De Philippis *et al.*, 1998).

#### 3.4.2.3.3.2 Les activités biologiques

Les EPS produits par les microalgues et les Cyanobactéries ont fait l'objet de nombreuses publications concernant leurs activités biologiques (Tableau 5). Cela comprend entre autre les pouvoirs antioxydant, antiviral, antifongique, antibactérien, antiparasitaire, anti-âge, anticancéreux et immunomodulateur. Ces études sont essentiellement effectuées sur les PS sulfatés (sPS) de microalgues rouges. L'EPS de *Rhodella grisea* est un agent antitussif spécifique de la toux laryngopharyngée. Il permet de diminuer la fréquence et l'intensité de la toux sans supprimer l'expectoration (Nosál'ová *et al.*, 2012).

Les EPS de *Rhodella violacea*, *Rhodella maculata*, *Porphyridium marinum* et *Porphyridium purpureum* possèdent une activité *in vitro* vis-à-vis des microsporidies et *in vivo* contre la nosérose des abeilles causée par *Nosema ceranae* (Roussel *et al.*, 2015).

Les EPS des microalgues peuvent également être utilisés comme anti-inflammatoires. C'est le cas du polymère isolé de *Porphyridium* sp. qui inhibe la migration de leucocytes jusqu'au site de l'inflammation (Matsui *et al.*, 2003).

Les sPS de *Porphyridium* sp., *Porphyridium cruentum* et *Rhodella reticulata* ont un pouvoir antioxydant (Sun *et al.*, 2009 ; Tannin-Spitz *et al.*, 2005 ; Chen *et al.*, 2010a), de même que les EPS de *Scenedesmus quadricauda* et *Chlorella vulgaris* (Mohamed, 2008). L'activité antioxydante du polymère est dépendante de sa concentration. Les meilleures activités des sPS de *Chlorella vulgaris* (83 %) et *Scenedesmus quadricauda* (93 %) sont obtenues à la plus haute concentration testée (100 mg.mL<sup>-1</sup>).

**Tableau 5, partie 1** : Activités biologiques des EPS de microalgues et de Cyanobactéries.

Espèces	Activités	Références
<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Porphyridium</i> sp., <i>P. cruentum</i> , <i>Rhodella reticulata</i> , <i>Scenedesmus quadricauda</i>	Antioxydant	Sun <i>et al.</i> (2009) ; Mohamed (2008) ; Tannin-Spitz <i>et al.</i> (2005) ; Chen <i>et al.</i> (2010a)
<i>Rhodella grisea</i>	Antitussif	Nosálová <i>et al.</i> (2012)
<i>Porphyridium cruentum</i> , <i>Rhodella reticulata</i> , <i>Thraustochytriidae</i> sp.	Anticancéreux	Gardeva <i>et al.</i> (2009) ; Sun <i>et al.</i> (2012) ; Geresh <i>et al.</i> (2002) ; Park <i>et al.</i> (2017)
<i>Porphyridium cruentum</i> , <i>Gyrodinium impudicum</i> , <i>Thraustochytriidae</i> sp.	Immunomodulateur	Sun <i>et al.</i> (2012) ; Yim <i>et al.</i> (2005) ; Bae <i>et al.</i> (2006) ; Park <i>et al.</i> (2017)
<i>Porphyridium</i> sp.	Anti-inflammatoire	Matsui <i>et al.</i> (2003)
<i>Cochlodinium polykrikoides</i> , <i>Gyrodinium impudicum</i> , <i>Porphyridium</i> sp., <i>P. cruentum</i> , <i>Phaeodactylum tricornutum</i> , <i>Dunaliella bardawil</i> , <i>D. tertiolecta</i> , <i>Chlorella autotrophica</i>	Antiviral	Huleihel <i>et al.</i> (2001, 2002) ; Hasui <i>et al.</i> (1995) ; Huang <i>et al.</i> (2005) ; Yim <i>et al.</i> (2003) ; Fábregas <i>et al.</i> (1999b) ; Talyshinsky <i>et al.</i> (2002) ;

**Tableau 5, partie 2** : Activités biologiques des EPS de microalgues et de Cyanobactéries.

Espèces	Activités	Références
<i>Rhodella reticulata</i> , <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , <i>Phormidium</i> sp., <i>Nostoc muscorum</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>C. ellipsoidea</i> , <i>Synechocystis</i> sp., <i>Nostoc entophyllum</i> , <i>Chroococcus dispersus</i> , <i>Gloeocapsa</i> sp.	Antibactérien	Najdenski <i>et al.</i> (2013) ; Ghasemi <i>et al.</i> (2007)
<i>Rhodella violacea</i> , <i>R. maculata</i> , <i>Porphyridium marinum</i> , <i>P. purpureum</i>	Antiparasitaire	Roussel <i>et al.</i> (2015)
<i>Gloeocapsa</i> sp., <i>Nostoc entophyllum</i> , <i>Synechocystis</i> sp., <i>Rhodella reticulata</i> , <i>Chroococcus dispersus</i> , <i>Oocystis</i> sp., <i>Chlorella vulgaris</i>	Antifongique	Najdenski <i>et al.</i> (2013) ; Ghasemi <i>et al.</i> (2007)
<i>Porphyridium</i> sp.	Hypocholestérolémiant	Dvir <i>et al.</i> (2009)
<i>Porphyridium cruentum</i>	Hypoglycémique	Huang <i>et al.</i> (2006)
<i>Porphyridium cruentum</i>	Anti-âge	Bayona <i>et al.</i> (2012)

Des propriétés antibactérienne et antifongique ont aussi été attribuées aux EPS *Gloeocapsa* sp. et *Synechocystis* sp. Ils inhibent la prolifération de *Staphylococcus aureus*, avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) égales à 0,125 et 1,00 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivement (Najdenski *et al.*, 2013). De plus le polymère isolé de *Gloeocapsa* sp. est le seul à inhiber la croissance du champignon *Candida albicans*, et celui de *Synechocystis* sp. à inhiber la croissance de *Pseudomonas aeruginosa*. La CMI varie fortement d'un polymère à l'autre, et d'une souche bactérienne à l'autre. Par exemple, les CMI du polymère de *Rhodella reticulata* sont comprises entre 0,25 et 1,0 mg.mL<sup>-1</sup> (Najdenski *et al.*, 2013).

Des activités antivirales ont aussi été mises en lumière. C'est le cas du PS isolé de *Cochlodinium polykrikoides* qui possède des propriétés antivirales *in vitro* contre les virus de la grippe de types A et B (Hasui *et al.*, 1995). Des activités contre les virus respiratoires syncytial (RSV-A et RSV-B) ont aussi été démontrées. De plus, le PS inhibe la réplication du virus HIV-1

à une concentration  $IC_{50}$  égale à  $1,7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . L'EPS sulfaté de *Porphyridium* sp. a également un effet antiviral, mais contre le virus de l'herpès (HSV-1 et HSV-2) (Huleihel *et al.*, 2001). Cette activité augmente avec la concentration du polymère. Celle-ci est optimale à  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Enfin, le polysaccharide sulfaté p-KG03 isolé de *Gyrodinium impudicum* possède une forte activité contre le virus de l'encéphalomyocardite (EMCV) (Yim *et al.*, 2003).

L'EPS de *Porphyridium cruentum* est également décrit pour ses activités antitumorale et immunomodulatrice (Sun *et al.*, 2012). Il améliore la réponse immunitaire en stimulant la prolifération des macrophages et des lymphocytes. De plus ces activités sont renforcées lorsque la molécule est de petite taille ( $M_w = 6,55 \times 10^4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) par comparaison avec les tailles supérieures ( $M_w = 2,56 \times 10^5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) (Sun *et al.*, 2012).

#### 3.4.2.3.3.3 Marchés industriels et Brevets

Compte tenu de leurs propriétés rhéologiques et de leurs activités biologiques, les sPS des espèces du genre *Porphyridium* ont été très largement décrits pour leurs applications potentielles dans les domaines de l'alimentation, de la cosmétique et de la pharmaceutique. A l'exception de l'industrie cosmétique, leur valorisation dans les autres domaines (thérapeutique, l'alimentation humaine et animale, nutraceutique) est très réduite, principalement en raison des coûts de production encore trop élevés et du manque d'informations sur leur structure (degré de complexité très élevé). La partie suivante traite de quelques exemples d'utilisation d'EPS dans divers domaines industriels et concerne principalement des EPS de microalgues rouges.

##### 3.4.2.3.3.3.1 Marché de la nutraceutique

La nutraceutique concerne toutes les biomolécules ayant un effet positif sur la santé. A l'heure actuelle les extraits de spiruline sont les produits à base de microorganismes photosynthétiques les plus représentés sur ce marché en pleine croissance depuis vingt ans (Bernal *et al.*, 2011). Il existe de nombreuses informations dans la littérature sur les activités nutraceutiques des EPS. Dvir *et al.* (2009) ont montré que le PS de *Porphyridium* sp. possédait une activité hypocholestérolémiant (modèle rat). Il permettait de diminuer les taux de cholestérol et avait un effet positif sur le métabolisme des lipides. Cette activité a été brevetée par la société Solazyme en 2006 (Dillon *et al.*, 2007a). La même année, la société Solazyme a

développé une composition possédant une activité antioxydante à partir de PS de microalgues rouges du genre *Porphyridium* (Dillon *et al.*, 2007b). Cette formulation permet de réduire l'inflammation et de prévenir les dommages oxydatifs dans les tissus des mammifères. Le PS de *Porphyridium* sp. peut également être utilisé pour la lubrification des articulations grâce à ses propriétés rhéologiques (Arad *et al.*, 2006). Des formulations basées sur cette observation ont été brevetées par Dillon *et al.* (2007c) et Arad & Atar (2006). Enfin, Huang *et al.* (2006) ont montré que le PS d'une souche de *Porphyridium* pouvait être employé pour faire baisser la concentration de glucose dans le sang (glycémie).

#### 3.4.2.3.3.2 Marché de la cosmétique

Ce marché est le plus développé pour l'utilisation des EPS de microalgues et de Cyanobactéries. Les EPS des Rhodophyta sont principalement employés sur ce marché en raison de leurs activités biologiques, et plus spécifiquement de leurs activités anti-inflammatoire, antimicrobienne et antioxydante. Ils sont également décrits comme agents hydratant et de renforcement de la fonction de barrière de la peau (Chen *et al.*, 2010a ; Tannin-Spitz *et al.*, 2005). Bayona *et al.* (2012) ont suggéré que le sPS de *Porphyridium cruentum* puisse être utilisé comme ingrédient actif dans les formulations cosmétiques et pharmaceutiques en raison de ses activités. Les auteurs ont testé ces activités sur 3 enzymes impliquées dans l'apparence de la peau. Le PS était capable de diminuer fortement l'activité de la hyaluronidase d'environ  $96,6 \pm 0,3$  % à des concentrations comprises entre 0,25 et 2,5 mg.mL<sup>-1</sup>. Il était aussi capable de réduire l'activité de l'élastase d'environ  $46,0 \pm 7,1$  % à une concentration de 5 mg.mL<sup>-1</sup>. Ces résultats suggèrent que ce biopolymère pourrait être employé dans les formulations pour maintenir une bonne apparence de la peau. Cette activité a été brevetée par la société Solazyme (Dillon *et al.*, 2007d). Un autre brevet a été déposé, toujours sur le marché des soins de la peau. Celui concerne l'utilisation de sPS pour améliorer la fonction barrière de la peau, ainsi que son hydratation. Ce brevet, développé par la société L'Oréal est un mélange des sPS de *Porphyridium* sp., d'une bactérie marine et d'ulvane, associés à un C-glycoside (Potter *et al.*, 2014). Cette même société a développé un autre brevet basé sur l'utilisation des PS pour lutter contre les pellicules des cheveux (Potter *et al.*, 2013). La formulation biologique, comprenant un sPS de *Porphyridium* sp. vise à éliminer et/ou réduire les pellicules du cuir chevelu, au détriment des moyens actuels

tel que le zinc pyrithione. Récemment, **Yanhui (2017)** a développé une formulation cosmétique à partir de PS de *Porphyridium* ayant pour fonctions de réparer et de renforcer la barrière cutanée.

### **3.4.2.3.3.3 Marchés de la pharmaceutique et/ou de la thérapie**

Les PS tels que le hyaluronate peuvent être utilisés comme chélateurs dans les formulations pharmaceutiques destinées à délivrer des ions métalliques (**Nimrod & Greenman, 1988**). Le brevet US20110070159A1 déposé par **Arad (2009)** est basé sur cette faculté. Les EPS des microalgues rouges peuvent aussi être exploités comme molécules bioactives. Le brevet déposé par **Arad et al. (1997)** montre que les PS des Rhodophyta sont des agents antiviraux vis-à-vis du virus Varicella Zoster. Ce brevet montre aussi qu'une préparation à partir d'un ou de plusieurs PS issus de *Porphyridium* sp., *Porphyridium aerugineum* et *Rhodella reticulata* peut prévenir les infections virales et la réplication du virus. Les EPS de *Porphyridium* et *Rhodella* peuvent également servir pour prévenir les infections des abeilles par les microsporidies (**Michaud et al., 2013**).

### **3.4.2.3.3.4 Autres**

Les PS peuvent aussi être utilisés comme agent réducteur de la traînée dans des régimes turbulents (**Gasljevic et al., 2008**). La réduction de la traînée est un phénomène d'écoulement qui, par la présence de très petites quantités d'additifs (polymères ou tensio-actifs) dans un fluide quelconque, consiste en une réduction significative du frottement à la paroi en régime turbulent. Certaines solutions d'additifs, en interagissant avec la structure de la turbulence conduisent à une réduction du frottement pouvant aller jusqu'à 80 % par rapport au solvant pur (**Hadri et al., 2010**). Ceci induit une réduction de la puissance de pompage de l'ordre de 30 %. La réduction de la traînée peut trouver son application dans des systèmes de chauffage et de refroidissement urbains, dans le domaine pétrolier (pipelines), etc. Ces propriétés réductrices de la traînée ont été testées sur les EPS des microalgues marines *Porphyridium cruentum*, *Rhodella maculata* et *Schizochlamydeella capsulata*. Celui de *Porphyridium cruentum* montrait le plus fort pouvoir réducteur de traînée, devant *Schizochlamydeella capsulata* et *Rhodella maculata* pour une même concentration (**Gasljevic et al., 2008**).



En conclusion, au regard de la très grande diversité des microalgues et des Cyanobactéries, du peu de souches étudiées et/ou identifiées comme productrices de ces biopolymères (seulement 48 et 29 genres, respectivement) et des propriétés rhéologiques et/ou des activités biologiques associées aux EPS, la recherche de nouvelles souches encore inconnues dans la littérature pour la production d'EPS aux propriétés innovantes constitue une démarche scientifique inédite, intéressante et originale.

## Chapitre II : Matériels & Méthodes

### 1. Matériel biologique : microalgues et Cyanobactéries

Les 166 souches de microalgues (150) et de Cyanobactéries (16) proviennent de la collection (Roscoff Culture Collection (RCC)) de la Station Biologique de Roscoff (SBR), (<http://roscoff-culture-collection.org/>) (**Tableau 6**). La taxonomie des souches est présentée dans le **Tableau 13** (pages 166-175).

**Tableau 6, partie 1** : Liste des souches de la RCC criblées.

N° RCC	Genres	Espèces
5	<i>Dunaliella</i>	sp.
6	<i>Dunaliella</i>	<i>tertiolecta</i>
26	<i>Microcystis</i>	sp.
76	<i>Thalassiosira</i>	<i>weissflogii</i>
96	<i>Aureococcus</i>	<i>anophagefferens</i>
97	<i>Aureoumbra</i>	<i>lagunensis</i>
119	<i>Tetraselmis</i>	sp.
128	<i>Tetraselmis</i>	<i>chui</i>
130	<i>Tetraselmis</i>	<i>striata</i>
133	<i>Tetraselmis</i>	<i>rubens</i>
232	<i>Leptolyngbya</i>	sp.
269	<i>Prochlorococcus</i>	sp.
377	<i>Chrysamoeba</i>	sp.
654	<i>Chroodactylon</i>	<i>ramnosum</i>
655	<i>Rhodella</i>	<i>maculata</i>
739	<i>Phaeocystis</i>	<i>globosa</i>
775	<i>Ditylum</i>	<i>brightwellii</i>
821	<i>Rhinomonas</i>	sp.
827	<i>Micromonas</i>	<i>commoda</i>
851	<i>Phaeocystis</i>	sp.
903	<i>Coccomyxa</i>	sp.
908	<i>Phaeocystis</i>	sp.
925	<i>Phaeocystis</i>	sp.
940	<i>Phaeocystis</i>	sp.

 : aucune information disponible

**Tableau 6, partie 2** : Liste des souches de la RCC criblées

N° RCC	Genres	Espèces
1082	<i>Pseudochattonella</i>	<i>verruculosa</i>
1084	<i>Synechococcus</i>	sp.
1108	<i>Ostreococcus</i>	<i>tauri</i>
1170	<i>Calcidiscus</i>	<i>leptoporus</i>
1178	<i>Calyptrosphaera</i>	<i>sphaeroidea</i>
1180	<i>Calyptrosphaera</i>	sp.
1186	<i>Chrysochromulina</i>	<i>camella</i>
1196	<i>Glossomastix</i>	sp.
1216	<i>Emiliana</i>	<i>huxleyi</i>
1217	<i>Emiliana</i>	<i>huxleyi</i>
1314	<i>Gephyrocapsa</i>	<i>oceanica</i>
1337	<i>Hymenomonas</i>	<i>coronata</i>
1342	<i>Imantonia</i>	<i>rotunda</i>
1395	<i>Chrysotila</i>	<i>roscoffensis</i>
1456	<i>Scyphosphaera</i>	<i>apsteinii</i>
1489	<i>Lepidodinium</i>	<i>chlorophorum</i>
1490	<i>Alexandrium</i>	<i>minutum</i>
1501	<i>Fibrocapsa</i>	<i>japonica</i>
1502	<i>Heterosigma</i>	<i>akashino</i>
1504	<i>Chroomonas</i>	sp.
1512	<i>Thoracosphaera</i>	<i>heimii</i>
1513	<i>Karenia</i>	<i>mikimotoi</i>
1515	<i>Scrippsiella</i>	<i>trochoidea</i>
1517	<i>Prorocentrum</i>	<i>micans</i>
1521	<i>Symbiodinium</i>	<i>voratum</i>
1522	<i>Amphidinium</i>	<i>carterae</i>
1525	<i>Pavlova</i>	<i>enorae</i>
1528	<i>Rebecca</i>	sp.
1536	<i>Exanthemachrysis</i>	sp.
1537	<i>Diacronema</i>	<i>lutheri</i>
1544	<i>Exanthemachrysis</i>	sp.
1545	<i>Pavlova</i>	<i>gyrans</i>
1564	<i>Tetraselmis</i>	<i>globosa</i>
1714	<i>Thalassiosira</i>	sp.
1719	<i>Phaeocystis</i>	<i>globosa</i>

 : aucune information disponible

**Tableau 6, partie 3** : Liste des souches de la RCC criblées.

N° RCC	Genres	Espèces
1774	<i>Acaryochloris</i>	<i>tomasi</i>
1786	<i>Spirulina</i>	sp.
1805	<i>Nephroselmis</i>	sp.
1863	<i>Minutocellulus</i>	sp.
1978	<i>Rhinomonas</i>	sp.
1978	<i>Rhodomonas</i>	sp.
1983	<i>Acaryochloris</i>	<i>marina</i>
2035	<i>Synechococcus</i>	sp.
2055	<i>Phaeocystis</i>	sp.
2321	<i>Oolithotus</i>	<i>fragilis</i>
2336	<i>Pycnococcus</i>	<i>provasolii</i>
2340	<i>Chlorella</i>	sp.
2350	<i>Ochromonas</i>	sp.
2352	<i>Bigelowiella</i>	<i>natans</i>
2368	<i>Synechococcus</i>	sp.
2380	<i>Synechococcus</i>	sp.
2381	<i>Synechococcus</i>	sp.
2383	<i>Synechococcus</i>	sp.
2436	<i>Cyanobium</i>	sp.
2558	<i>Odontella</i>	sp.
2564	<i>Chaetoceros</i>	sp.
2598	<i>Nitzschia</i>	sp.
2608	<i>Cylindrotheca</i>	sp.
2614	<i>Hemiselmis</i>	sp.
2616	<i>Heterocapsa</i>	sp.
2624	<i>Papiliocellulus</i>	sp.
2638	<i>Nitzschia</i>	sp.
2684	<i>Prasinococcus</i>	sp.
2686	<i>Prasinoderma</i>	sp.
2696	<i>Aureoumbra</i>	<i>lagunensis</i>
2703	<i>Xenococcus</i>	sp.
2932	<i>Skeletonema</i>	sp.
2964	<i>Stylonema</i>	sp.
2976	<i>Ochrosphaera</i>	sp.

 : aucune information disponible

**Tableau 6, partie 4** : Liste des souches de la RCC criblées.

N° RCC	Genres	Espèces
3003	<i>Pelagodium</i>	sp.
3065	<i>Picochlorum</i>	sp.
3069	<i>Pelagococcus</i>	sp.
3072	<i>Proteomonas</i>	sp.
3092	<i>Navicula</i>	sp.
3093	<i>Guinardia</i>	<i>flaccida</i>
3390	<i>Guanchochroma</i>	<i>wildpretii</i>
3402	<i>Picocystis</i>	<i>salinarum</i>
3421	<i>Haptolina</i>	<i>hirta</i>
3426	<i>Prymnesium</i>	<i>parvum</i>
3436	<i>Chroomonas</i>	sp.
3438	<i>Pavlova</i>	sp.
3439	<i>Pycnococcus</i>	<i>provasolii</i>
3440	<i>Coccomyxa</i>	sp.
3443	<i>Chlamydomonas</i>	sp.
3448	<i>Chlamydomonas</i>	sp.
3452	<i>Chlamydomonas</i>	sp.
3459	<i>Diacronema</i>	<i>viridis</i>
3466	<i>Heterocapsa</i>	sp.
3473	<i>Heterocapsa</i>	sp.
3514	<i>Diacronema</i>	sp.
3539	<i>Phaeocystis</i>	sp.
3635	<i>Ochrosphaera</i>	sp.
3641	<i>Ochrosphaera</i>	sp.
3644	<i>Nannochloris</i>	sp.
3649	<i>Proteomonas</i>	<i>sulcata</i>
3650	<i>Ochrosphaera</i>	<i>verrucosa</i>
3656	<i>Biecheleriopsis</i>	sp.
3685	<i>Glossomastix</i>	sp.
3686	<i>Isochrysis</i>	<i>braarudii</i>
3688	<i>Glossomastix</i>	sp.
3699	<i>Tisochrysis</i>	<i>lutea</i>
3704	<i>Scyphosphaera</i>	<i>apsteinii</i>
3707	<i>Glossomastix</i>	sp.
3777	<i>Coccolithus</i>	<i>braarudii</i>

☒ : aucune information disponible

**Tableau 6, partie 5** : Liste des souches de la RCC criblées.

N° RCC	Genres	Espèces
4019	<i>Symbiodinium</i>	<i>kawagutii</i>
4037	<i>Pavlova</i>	sp.
4061	<i>Ruttnera</i>	<i>lamellosa</i>
4070	<i>Pavlova</i>	sp.
4078	: aucune information disponible	
4094	<i>Aureococcus</i>	<i>anophagefferens</i>
4120	<i>Pavlova</i>	sp.
4212	<i>Pyramimonas</i>	sp.
4222	<i>Bathycoccus</i>	<i>prasinus</i>
4299	<i>Nodularia</i>	<i>spumigena</i>
4435	<i>Tetraselmis</i>	sp.
4438	<i>Rhizochromulina</i>	sp.
4470	<i>Phaeomonas</i>	sp.
4555	<i>Synechococcus</i>	sp.
4621	<i>Aurearena</i>	<i>cruciata</i>
4628	<i>Porphyridium</i>	sp.
4631	<i>Andersenia</i>	<i>nodulosa</i>
4633	<i>Chrysotila</i>	sp.
4634	<i>Cochlodinium</i>	<i>polykrikoides</i>
4635	<i>Karenia</i>	<i>brevis</i>
4657	<i>Minidiscus</i>	<i>trioculatus</i>
6688	<i>Rebecca</i>	sp.
18/1	: aucune information disponible	
A13 880	: aucune information disponible	
AST 713	: aucune information disponible	
AST 714	: aucune information disponible	
CC 14	: aucune information disponible	
CC 19	<i>Guanchochroma</i>	<i>wildpretii</i>
CC 20	: aucune information disponible	
CC 21	: aucune information disponible	
CC 76	: aucune information disponible	
JAP PR7	: aucune information disponible	
JAP PR8	: aucune information disponible	
KO 334	: aucune information disponible	
OSH 51	: aucune information disponible	

 : aucune information disponible

## 2. Techniques de biologie moléculaire

### 2.1 Identification des souches

Les appartenances phylogénétiques des souches *Glossomastix* sp. (RCC3688 et RCC3707) et RCC4633 ont été déterminées après extraction de leur ADN et séquençages de fragments amplifiés par PCR.

#### 2.1.1 Extraction d'ADN

L'ADN est extrait à partir de 9 mL de culture à  $3,4 \times 10^6$  cellules.mL<sup>-1</sup>. La biomasse est centrifugée à 14 000 g pendant 20 min. Le culot est resuspendu dans 200 µL d'eau milliQ puis incubé à -20 °C pendant 30 min. Six cent µL d'eau Milli-Q sont ajoutés à la suspension qui est ensuite traitée par sonification avec un sonicateur Hielscher UP50H (cycle 0,5 ; amplitude 50 % ; 20 répétitions). L'ADN est ensuite extrait par la méthode du phénol/chloroforme (Stenesh, 1989). Huit cent µL de phénol sont ajoutés à la suspension précédente. Le mélange est homogénéisé doucement manuellement par retournements puis centrifugé à 10 000 g pendant 3 min. La phase supérieure est transférée dans un nouveau tube. Cette étape est réalisée à nouveau 2 fois. Huit cent µL de chloroforme sont ajoutés à la dernière phase supérieure avant d'être centrifugés à 10 000 g pendant 1 min. La phase supérieure est transférée dans un nouveau tube avant ajout d'une solution d'acétate de sodium à 3 M (concentration à 0,3 M dans la solution finale). Enfin la solution est additionnée de 2 volumes d'éthanol absolu. Après 20 min à -20 °C la solution est centrifugée à 12 000 g pendant 30 min à 4 °C. Le surnageant est éliminé et le culot contenant l'ADN précipité est supplémenté par 500 µL d'éthanol 70 % froid (stocké à -20 °C). La suspension est alors centrifugée à 12 000 g pendant 15 min à 4 °C. Le surnageant est éliminé et le culot (ADN) est séché dans une étuve à 37 °C. Cinquante µL d'eau Milli-Q sont ajoutés à l'échantillon sec à température ambiante afin d'hydrater le culot. L'ADN est conservé à 4 °C dans un tube fermé hermétiquement.

#### 2.1.2 Amplification PCR et séquençage

Les segments d'ADN codant pour l'ARNr 18S, 28S et la grande sous-unité (dite « L ») de la RuBisCo (rbcL) sont amplifiés par PCR à l'aide des primers présentés dans les **Tableaux 7** et **8**. Les réactions de PCR sont réalisées dans un volume réactionnel de 50 µL, contenant le Tampon 1X (20 mM Tris-HCl (pH 8,8 à 25 °C), 10 mM KCl, 10 mM

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1 % Triton X-100), les dNTPs (0,4 mM), 1 U d'enzyme Pfu Polymerase (Promega), 100 pmol de chaque primer et 100 ng d'ADN génomique matriciel.

Le cycle de températures pour l'amplification PCR comprend une dénaturation initiale de 3 min à 94 °C suivie de 35 cycles :

- 1 min à 95 °C (dénaturation de l'ADN),
- 1 min à 56°C (hybridation),
- 1 min à 72°C (élongation).

L'étape d'élongation du dernier cycle est étendue à 10 min.

Les amplificats sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % (m/v) dans du tampon TAE 1X (Tris 2M, Acétate 1M, EDTA 50mM, pH 8) contenant du Bromure d'Ethidium (BET, 0,5 µg.mL<sup>-1</sup>). Les échantillons d'ADN sont mélangés avec du tampon de charge coloré afin de suivre leur migration. La migration s'effectue à 75 mV.cm<sup>-1</sup> de gel. Un mélange de standards de masses molaires connues est déposé sur le gel d'agarose afin d'évaluer la taille des fragments d'ADN amplifiés.

Les séquences des fragments d'ADN (amplifiats) sont déterminées par la société Eurofins Genomics.



**Tableau 7 :** Couples d'amorces utilisés pour l'amplification PCR et l'identification de la souche RCC4633.

Locus	Régions	Noms	Amorces	Sens	Séquences	Remarques	Références	
18S (SSU)	V4	Hap454	528long	Sens	GCGGTAATTCCAGCTCCAA	Spécifique Haptophyta	Egge <i>et al.</i> (2013)	
			PRYM01+7	Anti-sens	GATCAGTGAAAACATCCCTGG			
		Prym454	PRYM03+3	Sens	GTAAATTGCCCGAATCCTG			Spécifique Prymnesiophyceae
			HaptoR1	Anti-sens	CGAAACCAACAAAATAGCAC			
28S (LSU1)	D1-D2	LSU1	Lhapto8	Sens	GGTATCGGAGAAGGTGAGAATCCT	Spécifique Haptophyta	Bittner <i>et al.</i> (2013)	
			Lhapto20R_bis	Anti-sens	TCAGACTCCTTGGTCCGTGTTTCT			

**Tableau 8 :** Couples d'amorces utilisés pour les amplifications PCR et les identifications des souches RCC3688 et RCC3707.

Locus	Régions	Noms	Amorces	Sens	Séquences	Remarques	Références
28S	610-1260	Ping28S	1260F	Sens	GACGGTGGCCATGGAAGT	Spécifique Pinguiphyceae, Taille prévue de l'amplifiat : 643 pb	Construction Institut Pascal
			610R	Anti-sens	CAGAGGCTGCACACCTTG		
18S	91-610	Ping18S	91F	Sens	CTGCGAATGGCTCATTATATC	Spécifique Pinguiphyceae, Taille prévue de l'amplifiat : 515 pb	Construction Institut Pascal
			610R	Anti-sens	CGCTATTGGAGCTGGAATT		
	610-1030	Ping18S	610F	Sens	AATTCCAGCTCCAATAGCG	Spécifique Pinguiphyceae Taille prévue de l'amplifiat : 558 pb	Construction Institut Pascal
			1030R	Anti-sens	CTTGCGACCATACTCCCC		
rbcL	450-890	PingrbcL	450F	Sens	AACGTGAGCGTATGGATAAG	Spécifique Pinguiphyceae Taille prévue de l'amplifiat : 453 pb	Construction Institut Pascal
			890R	Anti-sens	TAATACCGTGGTTCTTTTGAC		

### 3. Construction d'un arbre phylogénétique

#### 3.1 Analyses statistiques

Les différences de niveaux de chaque monosaccharide dans la composition des EPS ont été testées pour 5 des 6 phyla de microalgues. Les Miozoa n'ont pas été inclus dans l'analyse car seules trois espèces ont été détectées productrices d'EPS, et seulement deux compositions en monosaccharides sont disponibles dans la littérature. Des tests de Kruskal-Wallis ont été effectués pour chaque monosaccharide. Lorsqu'une différence significative était trouvée ( $p < 0,05$ ), ce test était suivi de comparaisons multiples par paires entre les phyla (tests de Mann-Whitney). Les niveaux de significativité ont été ajustés selon la méthode de **Benjamini & Hochberg (1995)**.

#### 3.2 Création de l'arbre phylogénétique

Les données de compositions en monosaccharides de 81 microalgues (incluant celles de ce travail), appartenant à 15 classes différentes ont été compilées dans un arbre phylogénétique. Pour cela, des séquences nucléotidiques codant pour l'ARNr 18S ont été recherchées sur le site du National Center for Biotechnology Information (NCBI) pour l'ensemble de ces souches. Ce marqueur phylogénétique, largement employé dans les phylogénies moléculaires a été choisi en raison du nombre important de séquences disponibles pour les espèces intégrées dans cette étude. Pour 41 espèces, 1 à 3 séquences ont été retrouvées dans cette base de données. Pour les autres, des séquences obtenues à partir d'espèces appartenant au même genre ont été utilisées. D'autres séquences ont également été ajoutées afin de construire un arbre phylogénétique cohérent avec les arbres phylogénétiques récemment publiés (**Burki, 2014 ; Leliaert *et al.*, 2012 ; Worden *et al.*, 2015**).

Les 214 séquences ont ainsi été obtenues et alignées à l'aide de l'algorithme MUSCLE (**Edgar 2004**) disponible dans le logiciel MEGA 7 (**Kumar *et al.*, 2016**). L'arbre a été construit à l'aide de la méthode de Neighbor-Joining avec le logiciel MEGA 7 sur un total de 1248 positions, et en se basant sur la méthode des p-distances avec 200 bootstraps. Les compositions en monosaccharides (en % de la composition totale ou « présence/absence ») de 81 souches ont été ajoutées à cet arbre phylogénétique à l'aide de l'outil iTOL (**Letunic & Bork, 2016**). Toutes les classes étaient supportées par des valeurs de bootstraps supérieures à 0,92, sauf pour les classes des Zygnematophyceae (0,55), Chlorophyceae (0,54) et Trebouxiophyceae (0,35).

## 4. Mise en œuvre des cultures

### 4.1 Milieux de culture

#### 4.1.1 Milieux pour la culture des microalgues

Différents milieux de culture ont été utilisés au cours de ces travaux :

➤ Le milieu f/2 développé par **Guillard and Ryther (1962)** est un milieu de culture standard pour la culture des microalgues. Il est constitué pour 1 L d'eau de mer artificielle de : 100  $\mu\text{L}$  d'une solution de microéléments 10X, de 100  $\mu\text{L}$  d'une solution de vitamines 10X, de 0,0075 g de  $\text{NaNO}_3$  et de 0,00055 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Les compositions des solutions sont présentes dans le **Tableau 9**. Les solutions de microéléments et de vitamines 10X sont réalisées au préalable et stérilisées respectivement par autoclave à 121 °C pendant 20 min et filtration à 0,22  $\mu\text{m}$  puis stockées à 4 °C. Le pH du milieu est ajusté à 8-8,2 avant ajout des 100  $\mu\text{L}$  des solutions de microéléments 10X et vitamines 10X, puis le milieu est stérilisé par filtration sur membrane 0,22  $\mu\text{m}$  (Steritop, Millipore).

➤ Le milieu « f/2 modifié » a la même composition que le milieu f/2, à l'exception des concentrations en  $\text{NaNO}_3$  (1  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) et  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,2  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Les nouvelles concentrations de ce milieu de culture ont été déterminées par **Villay *et al.* (2013)** par une analyse stœchiométrique de la composition du milieu et comparaison avec la composition molaire moyenne des microalgues déterminée par **Pruvost & Cornet (2012)**. Ces concentrations ont été déterminées afin d'atteindre une concentration en biomasse de 1  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ .

➤ Le milieu « f/2 enrichi » a la même composition que le milieu f/2 mais où les concentrations en  $\text{NaNO}_3$  et  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  sont respectivement égales à 1,7 et 0,55  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectivement. Ces concentrations ont été déterminées avec la même méthode que celle employée pour le milieu « f/2 modifié », avec l'objectif d'atteindre une concentration en biomasse de 2  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ .

**Tableau 9** : Solutions pour l'élaboration des milieux de culture milieu f/2.

<b>Solution d'eau de mer artificielle</b>	
NaCl	28,13 g
KCl	0,77 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,6 g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	4,8 g
NaHCO <sub>3</sub>	0,11 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3,5 g
Eau Milli-Q	qsp 1000 mL
<b>Solution de microéléments 10X</b>	
Na <sub>2</sub> EDTA	4,16 g
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	3,15 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,01 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,022 g
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,01 g
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,18 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,006 g
Eau Milli-Q	qsp 100 mL
<b>Solution de vitamines 10X</b>	
Cyanocobalamine (B12)	0,0005 g
Thiamine (B1)	0,1 g
Biotine	0,0005 g
Eau Milli-Q	qsp 100 mL

#### 4.1.2 Milieu pour la culture des Cyanobactéries

Le milieu PCR-S11-Red Sea est le milieu développé par la collection de l'Institut Pasteur et utilisé pour la culture des Cyanobactéries par la SBR. Il est constitué pour 1 L de solution de Red Sea Salt de : 1 mL de solution Hepes-NaOH 1 M (pH 7,5), 1 mL de solution Na<sub>2</sub>-EDTA/FeCl<sub>3</sub>, 1 mL de tampon phosphate de sodium 50 mM (NaPO<sub>4</sub>, pH 7,5), 1 mL de solution (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (400 mM), 100 µL de solution métallique « Gaffron+Se » et 100 µL de solution de Cyanocobalamine (10 mg.L<sup>-1</sup>). Les compositions des solutions sont présentées dans le **Tableau 10**.

**Tableau 10** : Solutions pour l'élaboration du milieu PCR-S11-Red Sea.

<b>Hepes-NaOH 1 M (pH 7,5)</b>	
Hepes	119,15 g
Eau Milli-Q	qsp 250 mL
Ajuter le pH à 7,5	
Eau Milli-Q	qsp 500 mL
<b>Na<sub>2</sub>-EDTA/FeCl<sub>3</sub></b>	
FeCl <sub>3</sub>	1,080 g
HCl 0,1 M	qsp 40 mL
&	
Na <sub>2</sub> -EDTA	1,488 g
NaOH 0,1 M	qsp 40 mL
Mélanger les deux solutions	
Eau Milli-Q	qsp 2000 mL
<b>Tampon phosphate de sodium 50 mM (pH 7,5)</b>	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6 g
Eau Milli-Q	qsp 1000 mL
&	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,55 g
Eau Milli-Q	qsp 500 mL
Faire un mélange équimolaire des deux solutions	
Ajuster le pH à 7,5	
<b>Trace metals "Gaffron+Se"</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,186 g
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,101 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MO <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,00198 g
KBr	0,00516 g
KI	0,00714 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,00498 g
(Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,01725 g
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,00925 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,00876 g
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,0071 g
Cr(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	0,0024 g
VO <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0015 g
KAl(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .12H <sub>2</sub> O	0,0284 g
SeO <sub>2</sub>	0,0033 g
Eau Milli-Q	qsp 1000 mL

Ces solutions sont stockées à 4 °C entre chaque utilisation. La solution de Red Sea Salt est réalisée en solubilisant 33,33 g de Red Sea Salt dans 1000 mL d'H<sub>2</sub>O Milli-Q. Cette solution est stérilisée par autoclave à 121 °C pendant 20 min. Le reste des composants est stérilisé par autoclave (sauf vitamines) puis ajouté à la solution de Red Sea Salt sous hotte stérile par filtration 0,22 µm.

## **4.2 Conditions de cultures**

### **4.2.1 Le criblage**

Le criblage est réalisé sur l'ensemble des 166 souches de microalgues et Cyanobactéries. Les cellules sont cultivées en photoautotrophie dans des erlenmeyers de 50 mL contenant 20 mL de milieu f/2 (microalgues) ou PCR-S11-Red Sea (Cyanobactéries), inoculées avec 4 mL de culture de microorganismes en provenance de la SBR. Les fioles sont placées dans deux incubateurs éclairés (150 µmol photons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> et 300 µmol photons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) et soumises à un cycle jour/nuit de 16 h/8 h. L'objectif est que toutes les souches soient capables de se développer à au moins une de ces deux intensités lumineuses et d'étudier l'impact de l'irradiance sur la production d'EPS. La température est fixée à 20 °C et les fioles sont soumises à une agitation orbitale de 120 rpm.

Le criblage est réalisé pendant 30 jours. Des prélèvements (1 mL) sont effectués sur les cultures tous les 5 jours, du jour 0 (T<sub>0</sub> - début de l'expérience) au jour 30 (T<sub>30</sub> - fin de l'expérience). Des mesures d'absorbance (A<sub>750nm</sub>) sont réalisées afin d'estimer la croissance cellulaire. Après mesure de l'A<sub>750nm</sub>, les échantillons sont centrifugés à 5 000 g pendant 10 min à 20 °C et les surnageants sont collectés. Des dosages d'ions NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) et des oses totaux sont effectués sur les surnageants (parties II.5 et II.7.4).

### **4.2.2 Conditions de cultures pour l'obtention d'exopolysaccharides**

#### **4.2.2.1 Production d'exopolysaccharides en erlenmeyers**

Les souches détectées comme potentiellement productrices d'EPS lors du criblage sont cultivées dans des erlenmeyers de 500 mL contenant 200 mL de milieu « f/2 modifié » et 20 mL d'inoculum (de même pour la Cyanobactérie *Synechococcus* sp. (RCC2380)). Les cultures sont maintenues en photoautotrophie et les paramètres de culture utilisés lors du criblage sont conservés (20 °C, 120 rpm et 150 µmol photons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> avec un cycle jour/nuit de 16 h/8 h). Les cultures sont maintenues pendant environ 60 jours afin de maximiser la

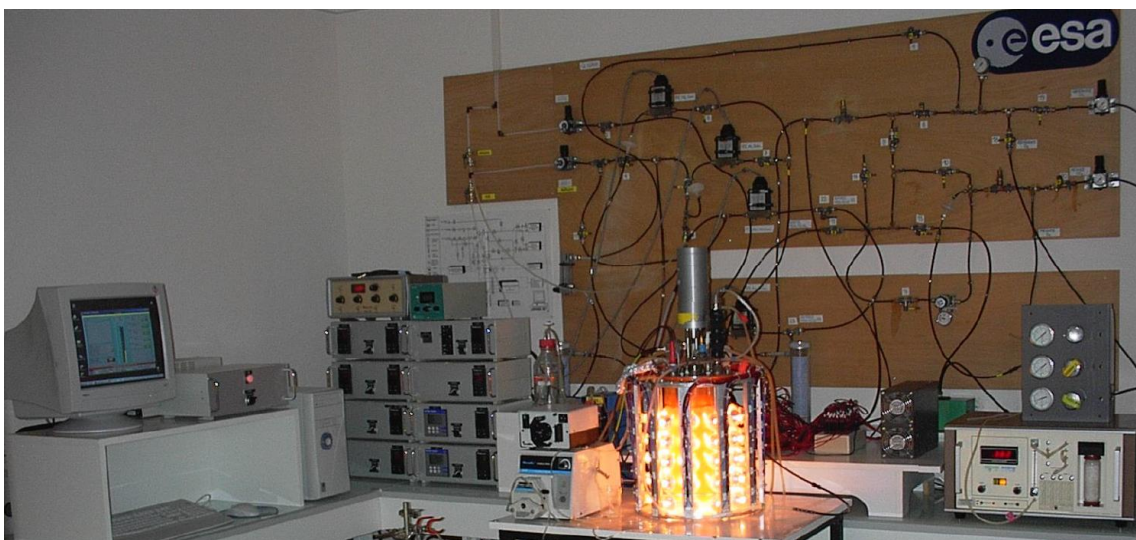
production cellulaire et la production d'EPS. Passé ce délai, les sucres extracellulaires sont extraits et purifiés comme décrit dans la partie II.6.1.

#### 4.2.2.2 Production d'exopolysaccharides en photobioréacteurs et airlift

Les microalgues dont la production d'EPS après culture en erlenmeyers a été confirmée par analyses en CPG/SM et CEAHP-DAP (partie II.8.1) sont mises en culture dans des PBR (cylindrique ou torique) ou en conditions airlift dans des bouteilles non agitées.

##### 4.2.2.2.1 Cultures en photobioréacteur cylindrique

Le PBR cylindrique utilisé possède un volume utile de 5 L et est éclairé par de la lumière blanche émise par 55 lampes halogènes (Sylvania professional 25, BAB 38°, 12 V, 20 W) situées en périphérie du PBR (éclairage radial externe) (**Figure 33**).



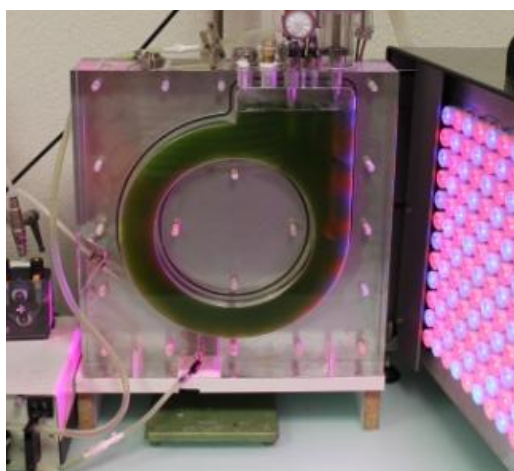
**Figure 33** : PBR cylindrique de 5 L.

L'irradiance est contrôlée et modulée par un générateur de tension variable. Elle est fixée à  $150 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  en début de culture puis augmentée au fur et à mesure de la densification cellulaire. L'intensité maximale a été variable suivant les expérimentations mais ne dépasse jamais les  $350 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Le PBR est pourvu de sondes, permettant un suivi des paramètres de culture (pH,  $\text{pO}_2$  et température). La température est fixée et maintenue à  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  à l'aide d'un cryostat. Un condensateur à  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  limite l'évaporation. Le pH est régulé à la fois par modification du taux de  $\text{CO}_2$  injecté dans le réacteur à un débit de  $100 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  (variable suivant la souche mais jamais supérieur à 3 %) et par ajouts d'HCl 1 M *via*

un septum. Le mélange Air/CO<sub>2</sub> est stérilisé par filtration (0,22 µm). L'agitation mécanique provient de 2 pales rushton dont la vitesse de rotation est fixée à 120 rpm puis augmentée en fonction de l'hétérogénéité des cultures. Un circuit de prélèvement relié à une pompe péristaltique permet le suivi des cultures (croissance, consommation de la source d'azote et production des glucides extracellulaires) (partie II.5). Les cellules sont cultivées en mode discontinu (batch) et en photoautotrophie sans phase d'obscurité. Les cultures en PBR (volume final 5 L) sont réalisées avec 4,2 L de milieu de culture « f/2 enrichi » et inoculées avec 800 mL d'inoculum en phase exponentielle.

#### 4.2.2.2 Cultures en photobioréacteur torique

Le PBR torique est un réacteur plan de 1,4 L utile en polycarbonate transparent afin de laisser pénétrer la lumière. La régulation thermique est assurée par circulation d'eau provenant d'un cryostat dans un compartiment situé à l'arrière du réacteur, et séparé de la chambre de culture par une plaque en inox. Le système lumineux est composé de 144 lampes LED (72 lampes rouges et 72 lampes bleues) situées devant le compartiment réservé à la culture (éclairage plan externe) (**Figure 34**).



**Figure 34** : PBR torique de 1,4 L.

Ce système est équipé d'un panneau de LED émettant à des longueurs d'ondes spécifiques des pigments qui interviennent dans le processus de photosynthèse (Chl *a* et *b*). L'intensité lumineuse est fixée à 150 µmol photons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> lors de l'inoculation du réacteur et est augmentée au fur et à mesure de la densification cellulaire. L'intensité maximale est variable en fonction des souches mises en culture. Ce PBR est équipé de capteurs de température et de pH. Les paramètres de culture (intensité lumineuse, température et pH) sont



contrôlés *via* un logiciel développé sous LabView et sont modulables au cours de l'expérimentation. La température est fixée à 20 °C et est maintenue stable *via* un cryostat. Le PBR dispose aussi d'un condenseur à effet Peltier pour réduire l'évaporation. Le pH est régulé à la fois par modification du taux de CO<sub>2</sub> injecté dans le réacteur à un débit de 200 mL.min<sup>-1</sup> (variable suivant la souche mais jamais supérieur à 3 %) et par ajouts d'HCl 1M *via* un septum. Le mélange Air/CO<sub>2</sub> est stérilisé par filtration (0,22 µm). L'agitation mécanique provient de 2 pales de type hélices marines. Elle est fixée à 100 rpm lors de l'inoculation puis évolue en fonction du type de culture. Un circuit de prélèvement relié à une pompe péristaltique permet de suivre les cultures (croissance, consommation de la source d'azote et production d'EPS) (partie II.5). Les cellules sont cultivées en mode batch et en photoautotrophie continue. Les cultures sont réalisées avec 1 L de milieu « f/2 enrichi » et inoculées avec 200 mL d'inoculum en phase exponentielle.

#### 4.2.2.2.3 Production en airlift

La souche *Glossomastix* sp. RCC3707 est cultivée en condition airlift dans des bouteilles (2 à 5 L) pour pallier à sa sensibilité à l'agitation mécanique. Les cultures airlift sont équipées d'un diffuseur d'air cylindrique relié à un réseau d'air comprimé stérilisé par filtration (0,22 µm). Les cultures sont réalisées à 20 °C (local climatisé) et illuminées par des néons fournissant une irradiance de 40 µmol photons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. La souche est cultivée en mode batch et en photoautotrophie avec un cycle jour/nuit de 16 h/8 h. Les cultures batch 2 et 5 L sont réalisées en milieu « f/2 enrichi » et inoculées respectivement par 200 et 500 mL d'inoculum en phase exponentielle. Le suivi de culture n'a pu être réalisé en raison d'agglomérats cellulaires multiples et de tailles variables au sein de la culture.

## 5. Suivi des cultures

### 5.1 Quantification de la biomasse

La croissance cellulaire des microalgues est déterminée par deux méthodes :

- mesure de la turbidité ( $A_{750\text{nm}}$ ) (Griffiths *et al.*, 2011),
- comptage en utilisant une cellule de Malassez. Les cellules sont comptées sur 20 carrés de 0,01 µL ce qui permet d'obtenir la concentration cellulaire moyenne, exprimée en nombre de cellules.mL<sup>-1</sup>. Les comptages sont réalisés en triplicat.

## 5.2 Dosage des ions nitrates

La concentration en ions nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) est déterminée *via* la méthode de **Cawse (1967)** modifiée par l'American Public Health Association (**A.P.H.A., 1971**). Le dosage s'effectue sur les surnageants de culture après une étape de centrifugation à 5 000 g pendant 10 min à 20 °C afin d'éliminer la biomasse cellulaire. Neuf cent  $\mu\text{L}$  d'une solution d'acide perchlorique à 5 % (m/v) sont mélangés à 100  $\mu\text{L}$  d'échantillon dans des tubes en verre. Les tubes sont agités vigoureusement au vortex et les  $A_{210\text{ nm}}$  et  $A_{275\text{ nm}}$  sont immédiatement mesurées dans des cuves en quartz (Spectrophotomètre UV-Visible CPS-240 A, Shimadzu). La mesure d'absorbance à 210 nm quantifie les ions  $\text{NO}_3^-$  et celle à 275 nm permet d'éliminer les interférences liées à l'éventuelle présence de nitrites (**Eq. 1**).

$$A_{\text{réelle}} = A_{210\text{nm}} - 2 \times (A_{275\text{nm}} - A_{275\text{nm}} \text{ moyenne}) \quad (\text{Eq. 1})$$

$A_{210\text{nm}}$  : mesure de l'échantillon à  $\lambda = 210\text{ nm}$

$A_{275\text{nm}}$  : mesure de l'échantillon à  $\lambda = 275\text{ nm}$

$A_{275\text{nm}} \text{ moyenne}$  : moyenne des mesures  $A_{275\text{nm}}$  de la gamme étalon

Les concentrations finales sont déterminées à partir d'une gamme étalon de solutions de  $\text{NaNO}_3$  comprises entre 0 et 0,1  $\text{g.L}^{-1}$  réalisée à partir d'une solution de  $\text{NaNO}_3$  à 0,5  $\text{g.L}^{-1}$ . Les  $A_{\text{réelles}}$  sont reportées sur cette gamme étalon afin d'obtenir la concentration en  $\text{NaNO}_3$  dans les échantillons, avant une conversion en équivalent ions  $\text{NO}_3^-$ . Ce dosage permet de visualiser la consommation de la source d'azote dans le milieu jusqu'à son épuisement.

## 5.3 Dosage des ions ammonium

Les ions ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) sont la source d'azote principale du milieu PCR-S11-Red Sea. Leur concentration est déterminée selon la réaction de Berthelot (**Patton & Crouch, 1977**). Le dosage s'effectue sur les surnageants de culture après une étape de centrifugation à 5 000 g pendant 10 min à 20 °C afin d'éliminer la biomasse cellulaire. Les ions ammonium vont réagir au contact simultané de l'hypochlorite de sodium et du phénol pour former un chromophore bleu détectable à 570 nm. Le dosage est réalisé en mélangeant 50  $\mu\text{L}$  d'échantillon à 500  $\mu\text{L}$  d'hypochlorite de sodium, auxquels sont ajoutés 500  $\mu\text{L}$  de phénol nitroprussiate et 3 mL d'eau Milli-Q. Les solutions sont mélangées puis placées à l'obscurité pendant 1 h avant de mesurer l' $A_{570\text{nm}}$  (Spectrophotomètre UV-Visible CPS-240 A, Shimadzu). Les concentrations finales exprimées en équivalent ions  $\text{NH}_4^+$  sont déterminées à partir d'une gamme étalon de solutions de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  comprises entre 0 et 80  $\text{mg.L}^{-1}$  réalisées à

partir d'une solution mère de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  à  $80 \text{ mg.L}^{-1}$ . Tout comme le dosage des ions nitrates, celui-ci permet de visualiser la consommation de la source d'azote dans le milieu jusqu'à son épuisement.

#### **5.4 Quantification des glucides extracellulaires**

La quantification des glucides extracellulaires s'effectue sur les surnageants de culture après une étape de centrifugation à  $5\,000 \text{ g}$  pendant  $10 \text{ min}$  à  $20 \text{ °C}$  afin d'éliminer la biomasse cellulaire. Les surnageants issus des prélèvements des cultures en PBR (partie II.4.2.2.2) sont traités à l'aide d'une cellule Amicon Ultra de  $4 \text{ mL}$  équipée d'une membrane d'acétate de cellulose de seuil de coupure de  $10 \text{ kDa}$  par des séries de concentrations (centrifugation à  $4\,000 \text{ g}$  pendant  $10 \text{ min}$  à  $20 \text{ °C}$ ) et dilutions avec de l'eau Milli-Q afin d'éliminer les sels du milieu de culture qui peuvent interférer lors du dosage. Les cycles de concentrations dilutions sont répétés cinq fois. La quantification des glucides extracellulaires des surnageants de culture traités est réalisée à l'aide du dosage des oses totaux (partie II.7.4).

### **6. Extraction et purification des exopolysaccharides**

#### **6.1 Polysaccharides issus des cultures en erlenmeyers**

Les cultures sont centrifugées à  $10\,000 \text{ g}$  pendant  $15 \text{ min}$  à  $20\text{°C}$  afin d'éliminer les cellules. Les surnageants contenant les EPS solubles sont traités à l'aide d'une cellule Amicon de  $300 \text{ mL}$  équipée d'une membrane d'acétate de cellulose (seuil de coupure :  $10 \text{ kDa}$ ) par des séries de concentrations dilutions avec de l'eau Milli-Q afin d'éliminer les sels et les molécules de faibles masses molaires. Les cycles de concentrations dilutions sont répétés jusqu'à obtention d'une conductivité des perméats équivalente à celle de l'eau (environ  $2 \mu\text{S.cm}^{-1}$ ). Les solutions concentrées d'EPS sont congelées à  $-80 \text{ °C}$  avant d'être lyophilisées (Thermo Electron Corporation, Heto PowerDry OL 6000). Les EPS secs sont stockés dans des flacons hermétiques à température ambiante jusqu'à utilisation.

#### **6.2 Polysaccharides issus des cultures en photobioréacteurs et airlift**

Les cultures sont centrifugées à  $14\,000 \text{ g}$  pendant  $25 \text{ min}$  à  $20 \text{ °C}$  afin d'éliminer les cellules et collecter les surnageants contenant les EPS solubles. Pour les cultures des souches RCC2380, RCC3438, RCC3688 et RCC3707, les surnageants sont dilués à  $1/3$  avec les milieux de culture correspondants afin de diminuer leurs viscosités et faciliter la centrifugation. Après centrifugation, les surnageants sont traités en ultrafiltration tangentielle

par des séries de concentrations dilutions avec un système Vivaflow 200 équipé d'une membrane en polyethersulfone (seuil de coupure de 50 kDa). Les cycles de concentrations dilutions sont effectués jusqu'à obtention d'une conductivité proche de  $2 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  dans le perméat. Le rétentat est congelé à  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  et séché par lyophilisation (Thermo Electron Corporation, Heto PowerDry OL 6000). Les échantillons d'EPS séchés sont conservés dans des flacons hermétiques à température ambiante jusqu'à utilisation.

## 7. Analyse de la composition des EPS

### 7.1 Dosage des oses neutres

Les teneurs en oses neutres des EPS sont déterminées par la méthode de **Monsigny *et al.* (1988)**. Le dosage des oses neutres repose sur une hydrolyse à chaud des liaisons glycosidiques en présence d'une solution concentrée d'acide sulfurique à 80 % ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Cette hydrolyse conduit à la formation des dérivés furfuraux qui vont réagir avec le résorcinol. Les chromophores formés peuvent être mesurés à une longueur d'onde  $\lambda = 450 \text{ nm}$ .

Le dosage s'effectue avec une solution de résorcinol à  $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  préparée avec de l'eau Milli-Q et stockée à  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Les échantillons sont solubilisés à  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  dans de l'eau Milli-Q pendant 24 h à  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  puis éventuellement dilués lors des dosages. Deux cent  $\mu\text{L}$  d'échantillon sont mélangés dans des tubes en verre avec 200  $\mu\text{L}$  de solution de résorcinol puis 1 mL d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  à 80 % (m/v). Les tubes sont fermés hermétiquement puis vortexés avant d'être placés au bain marie à  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  pendant 30 min à l'obscurité. Les mélanges réactionnels sont ensuite refroidis à température ambiante pendant 30 min à l'obscurité puis dilués avec 1,4 mL d'eau Milli-Q avant mesure de l' $A_{450\text{nm}}$  (Spectrophotomètre UV-Visible CPS-240 A, Shimadzu). Les mesures sont réalisées en triplicat. Les teneurs en oses totaux des échantillons sont obtenues en reportant les valeurs sur une gamme étalon de glucose de 0 à  $0,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  et exprimées en équivalent glucose. Une gamme étalon d'acide glucuronique est également réalisée de 0 à  $0,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  pour prendre en compte les interférences du dosage liées aux acides uroniques. Les teneurs en oses neutres sont alors obtenues en utilisant la formule corrective (**Eq. 2**) décrite dans la partie II.7.3.

### 7.2 Dosage des oses acides

Les teneurs en oses acides des EPS sont déterminées par la méthode colorimétrique de **Blumenkrantz & Asboe-Hansen (1973)** modifiée par **Filisetti-Cozzi & Carpita (1991)**. Le dosage des oses acides repose sur une hydrolyse à chaud des liaisons glycosidiques en

présence d'un acide minéral concentré. Cette hydrolyse entraîne une déshydratation des acides uroniques, suivie d'une cyclisation conduisant à la formation de dérivés d'acide 5-formylfuroïque. Ces dérivés vont réagir au contact du méta-hydroxydiphényl (m-HBP) pour former un chromophore qui peut être mesuré à une longueur d'onde  $\lambda = 520$  nm.

Le dosage s'effectue avec une solution de borax 0,12 M préparée en solubilisant 22,88 g de borax ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) dans 500 mL d'acide sulfurique 96 % (m/v) pendant 16 h à 4 °C et à l'obscurité. La solution de m-HBP est réalisée en solubilisant 100 mg de m-HBP dans 1 mL de diméthylsulfoxyde (DMSO). Ces solutions sont stockées à 4 °C. La solution de m-HBP/ $\text{H}_2\text{SO}_4$  est réalisée extemporanément en mélangeant 102  $\mu\text{L}$  de la solution de m-HBP avec 5 mL d'acide  $\text{H}_2\text{SO}_4$  80 % (m/v). Les échantillons à doser sont solubilisés dans de l'eau Milli-Q pendant 24 h à 4 °C à une concentration de 10  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  puis éventuellement dilués lors des dosages.

Deux cent  $\mu\text{L}$  d'échantillon sont placés dans des tubes en verre puis 1 mL de solution de borax 0,12 M est ajouté. Les tubes sont fermés hermétiquement puis mélangés au vortex avant d'être placés au bain marie à 90 °C pendant 60 min à l'obscurité. Deux cent  $\mu\text{L}$  de la solution de m-HBP/ $\text{H}_2\text{SO}_4$  sont ajoutés dès la sortie du bain marie. Après mélange au vortex les tubes sont replacés au bain marie à 90 °C pendant 2 min. Une coloration rose/violette apparaît. L' $A_{520\text{nm}}$  est ensuite mesurée au spectrophotomètre (Spectrophotomètre UV-Visible CPS-240 A, Shimadzu). Les mesures sont réalisées en triplicat. Les teneurs en oses acides des échantillons sont obtenues en reportant les valeurs sur une gamme étalon d'acide glucuronique réalisée avec des concentrations de 0 à 0,4  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ . La gamme est réalisée à partir d'une solution mère d'acide glucuronique à 5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  et les résultats sont exprimés en équivalent acide glucuronique.

### 7.3 Correction des interférences

Lors des dosages, des interférences entre les oses neutres et acides peuvent entraîner des erreurs de quantification. Celles-ci peuvent être corrigées grâce aux équations suivantes (Montreuil *et al.*, 1963) :

$$[\text{ON}] = [A_{\text{résorcinol}} - \beta(A_{\text{m-HBP}}/\beta')]/\alpha \quad (\text{Eq. 2})$$

$$[\text{OA}] = A_{\text{m-HBP}}/\beta' \quad (\text{la concentration en ON est négligeable lors du dosage des OA}) \quad (\text{Eq. 3})$$

$A_{\text{résorcinol}}$  : mesure de l'échantillon à  $\lambda = 450$  nm du dosage des Oses Neutres (ON)

$A_{\text{m-HBP}}$  : mesure de l'échantillon à  $\lambda = 520$  nm du dosage des Oses Acides (OA)

$\alpha$  : coefficient directeur de la gamme étalon glucose du dosage au résorcinol

$\beta$  : coefficient directeur de la gamme étalon acide glucuronique du dosage au résorcinol

$\beta'$  : coefficient directeur de la gamme étalon acide glucuronique du dosage au m-HBP

#### 7.4 Dosage des oses totaux

Les teneurs en oses totaux des EPS, ainsi que les contenus en oses totaux des prélèvements réalisés au cours du suivi de culture des PBR, sont déterminés par la méthode colorimétrique de **Dubois *et al.* (1956)** après une étape de purification (parties II.5.4 et II.6). Tout comme le dosage des oses neutres, celle-ci repose sur une hydrolyse à chaud des liaisons glycosidiques en présence d'une solution concentrée d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  95-97 %. Cette hydrolyse conduit à la formation des dérivés furfuraux qui vont réagir avec le phénol. Les chromophores formés peuvent être mesurés à une longueur d'onde  $\lambda = 485 \text{ nm}$ .

Le dosage s'effectue avec une solution de phénol à 5 % (m/v) préparée avec de l'eau Milli-Q et stockée à 4 °C. Les EPS sont solubilisés dans de l'eau Milli-Q pendant 24 h à 4 °C à une concentration de 10  $\text{g.L}^{-1}$  puis éventuellement dilués lors des dosages. Un mL d'échantillon est placé dans un tube en verre avec 1 mL de solution de phénol à 5 % (m/v). Cinq mL d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  95-97 % sont ajoutés. Les tubes sont fermés hermétiquement et laissés à température ambiante pendant 10 min. Les tubes sont mélangés au vortex puis incubés à température ambiante pendant 15 min avant d'être placés au bain marie à 35 °C pendant 30 min à l'obscurité. L' $A_{485\text{nm}}$  est alors mesurée (Spectrophotomètre UV-Visible CPS-240 A, Shimadzu). Les mesures sont réalisées en triplicat et les teneurs en oses totaux, exprimées en équivalent glucose, sont obtenues en reportant les valeurs sur une gamme étalon de glucose réalisée avec des concentrations comprises entre 0 à 0,1  $\text{g.L}^{-1}$ .

Pour déterminer les contenus en oses totaux des prélèvements du criblage, les quantités des réactifs et la méthode ont été adaptés. Deux cent  $\mu\text{L}$  d'échantillon sont placés dans des tubes en verre contenant 200  $\mu\text{L}$  de solution de phénol 5 % (m/v). Un mL d'acide  $\text{H}_2\text{SO}_4$  80 % est ajouté. Après homogénéisation au vortex, les tubes sont placés au bain marie à 90 °C pendant 30 min à l'obscurité puis incubés à température ambiante pendant 30 min, également à l'obscurité, avant de mesurer l' $A_{492\text{nm}}$  (Spectrophotomètre UV-Visible CPS-240 A, Shimadzu). Les mesures sont réalisées en triplicat et les teneurs en oses totaux sont obtenues en reportant les valeurs d'  $A_{492\text{nm}}$  sur une gamme étalon de glucose réalisée avec des concentrations comprises entre 0 et 0,4  $\text{g.L}^{-1}$  et exprimées en équivalent glucose.

## 7.5 Dosage des protéines

La teneur en protéines des EPS est déterminée avec la méthode de Lowry (**Lowry *et al.*, 1951**). Les EPS sont solubilisés dans de l'eau Milli-Q pendant 24 h à 4 °C à une concentration de 10 g.L<sup>-1</sup> puis éventuellement dilués avant dosage. Ce dosage colorimétrique repose sur la réaction des protéines avec un réactif cuivrique alcalin (réactif de Lowry), puis la réaction avec un second réactif dit phosphotungstomolybdique (réactif de Folin-Ciocalteu). Il entraîne une réduction des acides aminés aromatiques conduisant à la formation d'un complexe chromophore bleu qu'il est possible de mesurer à une longueur d'onde  $\lambda = 750$  nm. Le dosage s'effectue avec une solution de Lowry, composée d'un mélange de trois solutions (A, B et C) avec un ratio de 100 : 1 : 1, respectivement. Les compositions des différentes solutions sont présentées dans le **Tableau 11**.

**Tableau 11** : Solutions pour la réalisation du dosage de Lowry.

Solution A	
NaOH	2,86 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	14,31 g
Eau Milli-Q	qsp 500 mL
Solution B	
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1,42 g
Eau Milli-Q	qsp 100 mL
Solution C	
Na <sub>2</sub> tartrate.2H <sub>2</sub> O	2,85 g
Eau Milli-Q	qsp 100 mL

Cinq cent  $\mu$ L d'échantillon sont placés dans des tubes en verre puis 700  $\mu$ L de réactif de Lowry sont ajoutés. Les solutions sont homogénéisées brièvement au vortex et incubées à température ambiante pendant 20 min à l'obscurité. Le réactif de Folin-Ciocalteu est préparé extemporanément en diluant 5 mL dans 6 mL d'eau Milli-Q. Cent  $\mu$ L du réactif de Folin-Ciocalteu sont ajoutés au mélange précédent. Les tubes sont fermés hermétiquement, mélangés au vortex puis maintenus à température ambiante pendant 30 min à l'obscurité. L' $A_{750\text{nm}}$  est alors mesurée (Spectrophotomètre UV-Visible CPS-240 A, Shimadzu). Les mesures sont réalisées en triplicat. La teneur en protéines des échantillons est obtenue en

reportant les valeurs sur une gamme étalon d'Albumine de Sérum Bovin (ASB) préparée à des concentrations de 0 à 0,1 g.L<sup>-1</sup> et les résultats sont exprimés en équivalent ASB.

## 7.6 Dosage des sulfates

La teneur en sulfates des EPS est déterminée par la méthode turbidimétrique au BaCl<sub>2</sub>/gélatine (Dodgson & Price, 1962). Ce dosage repose sur une hydrolyse acide des PS qui permet la libération des ions sulfates constitutifs. Ces derniers, en présence de chlorure de baryum (BaCl<sub>2</sub>) et de gélatine vont former un précipité de BaCl<sub>2</sub> qui est quantifiable par mesure de l'A<sub>550nm</sub>. Cent vingt mg d'échantillon sont déposés dans des tubes en verre puis sont hydrolysés par ajout de 3 mL d'HCl 2 M. L'hydrolyse est réalisée pendant 2 h à 100 °C. Les tubes sont mélangés au vortex toutes les 30 min. L'hydrolysate est ensuite centrifugé à 13 000 g pendant 30 min à 20 °C. Un mL de surnageant est mélangé à 9 mL d'eau Milli-Q, 1 mL d'HCl 0,5 M et 500 µL du réactif BaCl<sub>2</sub>/gélatine. Ce réactif est préparé par dissolution de 150 mg de gélatine dans 50 mL d'eau Milli-Q à 70 °C. La solution est ensuite refroidie pendant 16 h à 4 °C puis 0,5 g de BaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O sont ajoutés. Les solutions sont incubées à température ambiante pendant 30 min puis mélangées au vortex avant de mesurer l'A<sub>550nm</sub> (Spectrophotomètre UV-Visible CPS-240 A, Shimadzu). Les mesures sont réalisées en triplicat. La teneur en sulfates des EPS est obtenue en reportant les valeurs sur une gamme étalon de sulfate de potassium (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) à des concentrations de 0 à 3 g.L<sup>-1</sup>. Les résultats sont exprimés en équivalent SO<sub>4</sub>.

## 7.7 Analyse par spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IR-TF)

La spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (ou spectroscopie IR-TF) a été utilisée afin d'identifier certains groupements moléculaires propres aux PS et obtenir leur signature infrarouge. Chaque liaison chimique absorbe le rayonnement infrarouge à une ou plusieurs longueurs d'ondes spécifiques, en fonction de leur nature et de leur conformation structurale. Les informations obtenues par spectroscopie IR-TF permettent d'identifier différents constituants et de valider les résultats obtenus par d'autres analyses, comme par exemple la présence des groupements sulfates. La fenêtre IR est décomposée en trois régions : le proche infrarouge (0,8 à 2,5 µm, 14 000 à 4 000 cm<sup>-1</sup>), le moyen infrarouge (2,5 à 25 µm, 4000 à 400 cm<sup>-1</sup>) et le lointain infrarouge (25 à 1000 µm, 400 à 10 cm<sup>-1</sup>) (Keirsse, 2003 ; Boutaleb, 2007). Les spectres ont été obtenus à l'aide d'un module de réflexion totale atténuée (RTA) qui permet d'analyser une fine couche d'échantillon. Les analyses infrarouges



ont été réalisées avec un spectromètre VERTEX 70 (Bruker) à transformée de Fourier, relié à un module RTA (Bruker, A225, cristal diamant). Les EPS purifiés secs sont disposés sur le diamant du module RTA, puis compressés (bras de compression) afin d'assurer un contact optimal entre l'échantillon et le diamant. Cinquante scans sont réalisés au cours d'une seule analyse entre 400 et 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Les spectres sont traités et analysés avec le logiciel Opus (version 7.2).

## **8. Caractérisation structurale des EPS**

### **8.1 Composition en monosaccharides**

Les compositions en monosaccharides des EPS sont obtenues après leur hydrolyse. Les oses sont ensuite analysés par Chromatographie Echangeuse d'Anions Haute Performance (CEAHP) couplée à un Détecteur Ampérométrique Pulsé (DAP), et par Chromatographie Phase Gaz (CPG) couplée à de la Spectrométrie de Masse (SM). Les deux analyses sont effectuées en parallèle car elles sont complémentaires l'une de l'autre. Le protocole utilisé en CEAHP-DAP ne permet pas de quantifier précisément le Xyl et le Man lorsqu'ils sont tous les deux présents dans un échantillon, en raison de temps de rétention proches, contrairement à l'analyse en CPG/SM qui permet de distinguer clairement ces deux monosaccharides. Par ailleurs, la CEAHP-DAP semble plus sensible pour détecter les acides uroniques. La préparation des échantillons varie en fonction de la méthode d'analyse.

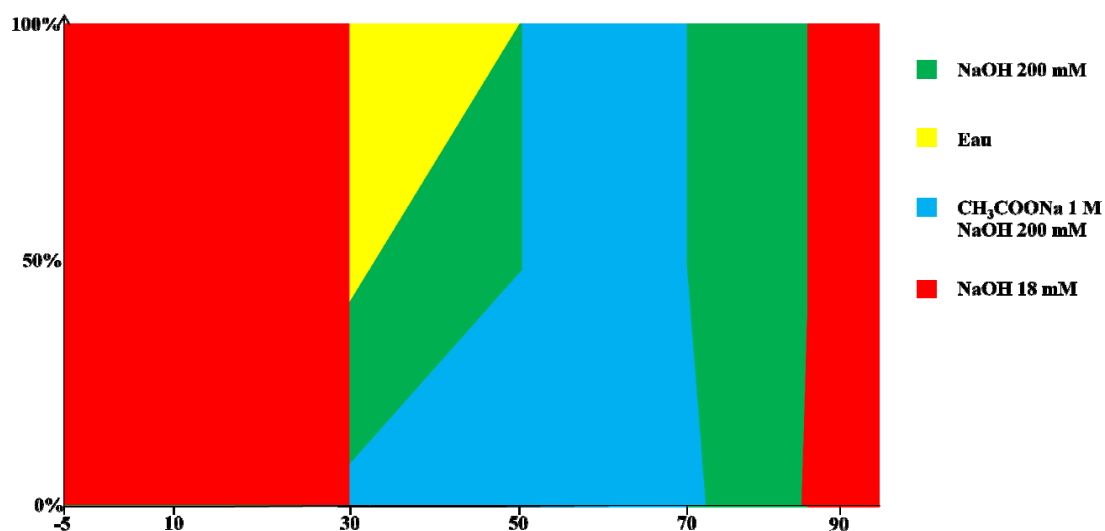
#### **8.1.1 Analyse par Chromatographie Echangeuse d'Anions Haute Performance couplée à un Détecteur Ampérométrique Pulsé (CEAHP-DAP)**

Dix mg de polysaccharides sont dissous dans 1 mL d'acide trifluoroacétique 2 M (TFA) dans un tube en verre fermé hermétiquement et chauffé à 120 °C pendant 90 min dans un bain marie sec. Les échantillons sont agités au vortex toutes les 30 min. Les échantillons hydrolysés sont ensuite neutralisés par addition d'hydroxyde d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{OH}$  35 % m/v) puis centrifugés à 14 000 g pendant 15 min à température ambiante. Les surnageants sont filtrés (0,22  $\mu\text{m}$ ) puis dilués à 1/10, 1/100 et 1/1000 dans un volume final de 1 mL avec de l'eau Milli-Q. Ils sont transférés dans des vials et peuvent être analysés immédiatement ou stockés à -20 °C. La détermination de la composition en monosaccharides est effectuée par CEAHP avec un système ICS 3000 (Dionex Corporation, Sunnyvale (CA), USA) équipé d'un DAP et d'un injecteur automatique AS 50. Vingt cinq  $\mu\text{L}$  d'échantillon sont injectés et élués à 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  dans une pré-colonne CarboPac PA1 (4  $\times$  50 mm) et une colonne CarboPac PA1

(4 × 250 mm) thermostatées à 25 °C et préalablement équilibrées pendant 15 min avec une solution de NaOH à 18 mM. L'élution est réalisée en mode isocratique avec une solution de NaOH 18 mM (gradient A) pendant 25 minutes, suivie d'un gradient linéaire d'acétate de sodium 0,5 M dans une solution de NaOH 200 mM pendant 20 min (gradient B) (Tableau 12, Figure 35).

**Tableau 12** : Composition des gradients pour l'analyse des polysaccharides en CEAHP-DAP.

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



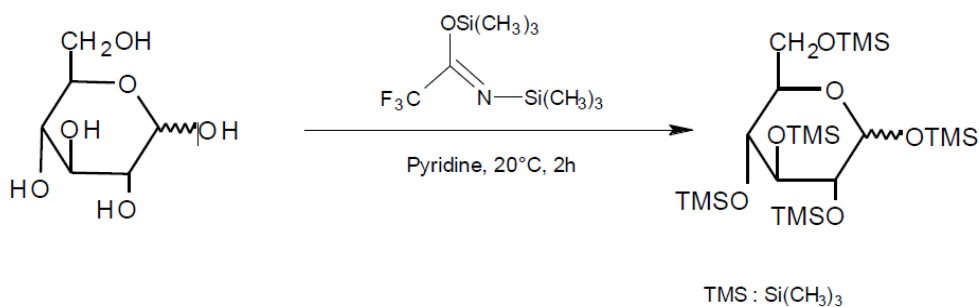
**Figure 35** : Gradient d'élution pour l'analyse des monosaccharides en CEAHP-DAP.

La phase stationnaire est une résine échangeuse d'anions constituée de billes de polystyrène et de divinylbenzène de 10 µm de diamètre, sur lesquelles sont agglomérées des particules fonctionnalisées par des groupements ammonium quaternaire (NR<sub>4</sub><sup>+</sup>). 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 des hydrolysats d'EPS ou des monosaccharides standards) sont transformés dans la phase mobile alcalines en alcoolates à des pH supérieurs au pKa de leurs fonctions hydroxyles (-OH → -O<sup>-</sup>). Les chromatogrammes sont collectés avec le logiciel d'acquisition Chromeleon (version 6.8, Sunnyvale, USA). Les monosaccharides standards utilisés sont : L-Rha, D-Rib, L-Fuc, L-Ara, D-Xyl, D-Man, D-Gal, D-Glc, D-GlcA, D-GalA, GlcN, GalN, GlcNAc et GalNAc.

### 8.1.2 Analyse par Chromatographie Phase Gaz couplée à de la Spectrométrie de Masse (CPG/SM).

La silylation est l'une des méthodes les plus répandues pour dériver des monosaccharides avant analyse en CPG/SM. Quinze mg de polysaccharides sont dissous dans 1,5 mL de TFA 2 M dans un tube en verre, fermé hermétiquement et chauffé à 120 °C pendant 90 min dans un bain marie sec. Les échantillons sont agités au vortex toutes les 30 min. Les échantillons hydrolysés sont ensuite évaporés à sec sous jet d'azote. Après remise en suspension des hydrolysats secs dans 1 mL de méthanol, les échantillons sont de nouveau évaporés sous jet d'azote. Cette étape est réalisée trois fois. L'étape suivante correspond à une triméthysilylation (**Figure 36**). Elle permet la substitution des atomes d'hydrogène des groupes fonctionnels -OH, -COOH, -NH, -NH<sub>2</sub> et -SH par des groupements triméthysilyle, rendant l'échantillon volatile (**Kataoka, 2005 ; Sajdak et al., 2017**).

Le *N,O*-bis(triméthysilyl)trifluoroacétamide (BSTFA 99 %, v/v) et le triméthylchlorosilane (TMCS 1 %, v/v) sont les réactifs les plus utilisés pour la triméthysilylation de nombreuses fonctions (alcools, alcaloïdes, amines, acides carboxyliques, phénols, etc.). Le BSTFA agit comme donneur triméthylsilylique alors que le TMCS joue le rôle de catalyseur et augmente la réactivité du BSTFA, améliorant l'efficacité de la dérivation (**Kuroda, 2000 ; Shareef et al., 2004**).



**Figure 36** : Mécanisme de triméthysilylation des *O*-glycosides (adapté de **Kamerling *et al.*, 1975**).

L'étape de dérivation est adaptée de **Pierre *et al.* (2012, 2014)**. Les échantillons sont gardés sous agitation douce pendant 2 h à température ambiante dans un mélange de 1,5 mL de BSTFA et 1,5 mL de TMCS. Ils sont ensuite évaporés sous jet d'azote. Les produits *O*-triméthysilylés sont dissous dans 1,5 mL de dichlorométhane. Les échantillons sont ensuite dilués (1/5) dans un volume final de 1 mL de dichlorométhane. Ils sont transférés dans des vials avant d'être analysés. La détermination de la composition en monosaccharides est effectuée par CPG/SM-EI composée d'un système Agilent 6890 Series GC couplé à un détecteur Agilent 5973 Network Mass Selective. Les produits dérivés sont séparés en utilisant une colonne OPTIMA-1MS (30 m, 0,32 mm, 0,25 mm), sous flux d'hélium avec un débit de 2,3 mL.min<sup>-1</sup>. La pression de l'hélium est fixée à 8,8 psi et le rapport de division à 50:1. Le gradient de température est programmée à 100 °C pendant 3 min suivi d'un gradient linéaire jusqu'à 200 °C (à raison de 8 °C.min<sup>-1</sup>) puis d'un autre gradient jusqu'à une température finale de 215 °C (à raison de 5 °C.min<sup>-1</sup>). L'ionisation est réalisée par impact électronique (EI, 70 eV). La température de la trappe est fixée à 150 °C et les ions cibles sont analysés dans la plage de masse de 40 à 800 m/z. Ces ions sont détectés par un multiplicateur d'électrons. Les données collectées sont traitées avec le logiciel Enhanced Chemstation Data Analyzer G1701CA et une base de données construite avec le logiciel MestReNova (7.1.0-9185) permet l'identification des molécules. Les monosaccharides standards utilisés sont : L-Rha, D-Rib, L-Fuc, L-Ara, D-Xyl, D-Man, D-Gal, D-Glc, D-GlcA et D-GalA. Ils ont été dérivatisés en suivant le même protocole que celui décrit précédemment, y compris pour l'étape d'hydrolyse acide. Les concentrations des solutions standards sont égales à 0,5 g.L<sup>-1</sup>, 1 g.L<sup>-1</sup>, 2 g.L<sup>-1</sup>, 5 g.L<sup>-1</sup> et 10 g.L<sup>-1</sup>.

### 8.1.3 Détermination des liaisons glycosidiques

Pour élucider la structure d'un polysaccharide, il est fondamental d'identifier les liaisons glycosidiques impliquées dans l'association covalente des monosaccharides. La méthode la plus connue pour obtenir ces informations passe par une méthylation des groupements -OH libres du polysaccharide, suivie d'une hydrolyse acide des liaisons glycosidiques (Peña *et al.*, 2012, Figure 37). Les monosaccharides libérés sont ensuite réduits en alditols par l'action de borohydrure de sodium ( $\text{NaBH}_4$ ) ou de borodutéride de sodium ( $\text{NaBD}_4$ ) afin d'identifier le groupement -OH engagé dans une liaison glycosidique. Ces alditols sont ensuite acétylés au niveau des groupements -OH libres. Les molécules nouvellement formées sont qualifiées d'acétates d'alditols partiellement *O*-méthylés (AAPM). Cette méthode permet, après fragmentation par impact électronique d'accéder à des informations de structure telles que les positions des groupements *O*-méthyle et *O*-acétyle, qui traduisent respectivement celle des groupements -OH libres et engagés dans une liaison glycosidique (Carpita & Shea, 1988).

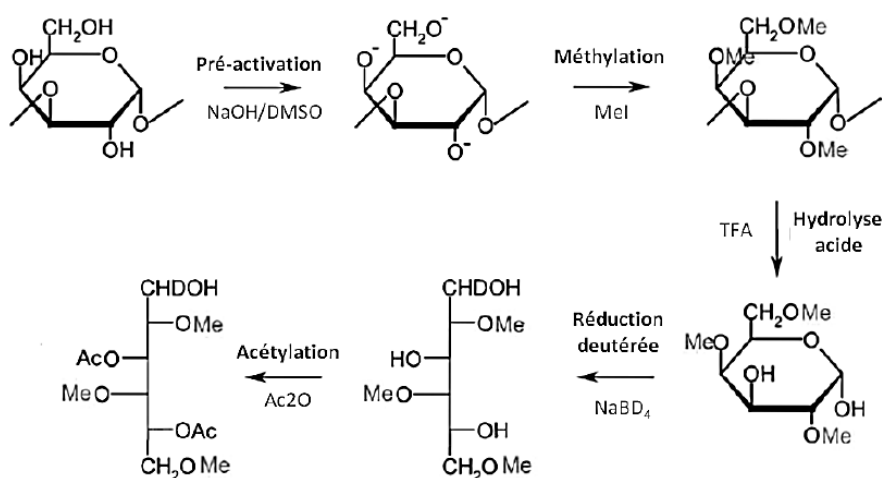


Figure 37 : Méthode de préparation des AAPM (adaptée de Garon-Lardière, 2004).

#### 8.1.3.1 Préparation du réactif NaOH/DMSO

La première étape de l'analyse des liaisons glycosidiques nécessite de pré-activer le PS par un traitement basique à base de NaOH et de diméthylsulfoxyde (DMSO) anhydre. La solution est préparée en mélangeant 100  $\mu\text{L}$  de solution de NaOH 50 % (m/v) avec 200  $\mu\text{L}$  de méthanol anhydre dans un tube en verre fermé hermétiquement. Le mélange est agité vigoureusement pendant 1 min puis 1 mL de DMSO anhydre est ajouté. Le nouveau mélange

est homogénéisé vigoureusement au vortex pendant 1 min puis centrifugé pendant 5 min à 3 600 g. Le surnageant est retiré et le culot de NaOH est additionné de 1 mL de DMSO anhydre. Comme précédemment le mélange est homogénéisé vigoureusement au vortex pendant 1 min puis centrifugé pendant 5 min à 3 600 g. Cette étape est répétée cinq fois. Le culot de NaOH doit être laiteux. Enfin, le culot est resuspendu dans 300 µL de DMSO anhydre. Cette solution est utilisée comme réactif pour l'étape suivante de méthylation.

### **8.1.3.2 Méthylation des polysaccharides**

Avant de réaliser l'étape de méthylation, 2 mg d'EPS sont solubilisés dans 500 µL de DMSO anhydre dans un tube en verre hermétique, sous agitation douce à 60 °C pour faciliter la solubilisation. Après solubilisation du polysaccharide, 200 µL du réactif NaOH/DMSO sont ajoutés, ainsi que 10 µL d'eau Milli-Q afin de constituer un milieu réactionnel basique favorable à la méthylation et limitant les dégradations oxydatives (**Ciucanu & Costello, 2003**). La solution est agitée durant 1 min, puis incubée pendant 15 min à température ambiante. Trois cent µL d'iodométhane (CH<sub>3</sub>-I) sont ajoutés au mélange. L'échantillon est mélangé au vortex pendant 1 min et maintenu à température ambiante pendant 15 min. Un mL d'eau milliQ est ajouté afin de stopper la réaction de méthylation. L'échantillon est homogénéisé au vortex et dégazé à plusieurs reprises puis transféré dans la glace. Il est ensuite placé sous un jet d'azote à 45 °C pour éliminer l'iodométhane en excès. Un mL de chloroforme est ajouté et le nouveau mélange est homogénéisé au vortex pendant 1 min puis centrifugé pendant 5 min à 3000 g. La phase organique (phase inférieure) est transférée dans un nouveau tube. Un mL d'eau milliQ est ajouté à la phase organique. La solution est mélangée au vortex pendant 1 min puis centrifugée pendant 5 min à 3000 g et la phase organique est de nouveau transférée dans un autre tube. Cette étape de lavage est répétée à trois reprises. Enfin le chloroforme est éliminé par évaporation sous jet d'azote à 55 °C. Le produit méthylé ou perméthylé est finalement repris dans du TFA 2 M pour hydrolyse des liaisons glycosidiques.

### **8.1.3.3 Formation des acétates d'alditols partiellement méthylés (AAPM)**

L'hydrolyse des liaisons glycosidiques est réalisée de la même manière que lors de la détermination de la composition en monosaccharides du polymère (partie II.8.1). L'échantillon obtenu lors de l'étape de méthylation est resuspendu dans 2 mL de TFA 2 M. A cette étape, l'échantillon méthylé ou perméthylé peut être remplacé par 2 mg des

monosaccharides standards qui ont été trouvés lors de l'analyse de la composition (L-Rha, L-Fuc, L-Ara, D-Xyl, D-Man, D-Gal, D-Glc, D-GalA, D-GlcA). Le tube est chauffé à 120 °C pendant 90 min dans un bain sec. L'échantillon est agité manuellement au vortex toutes les 30 min. Le mélange est évaporé sous jet d'azote. Un mL de méthanol est ajouté et l'échantillon est homogénéisé au vortex pendant 1 min. Après remise en suspension, l'échantillon est de nouveau évaporé sous jet d'azote. Cette étape est répétée trois fois puis l'échantillon sec peut être stocké à -20 °C et traité extemporainement une fois cette étape atteinte. La suite du protocole consiste en la réduction deutérée par le NaBD<sub>4</sub>. La solution de NaBD<sub>4</sub> est préparée en solubilisant 100 mg de produit dans 1 mL d'hydroxyde d'ammonium (NH<sub>4</sub>OH) à 1 M. Elle est ensuite diluée avec 5 mL de DMSO anhydre et homogénéisée au vortex. Six cent µL du mélange sont ajoutés à l'échantillon qui est incubé dans un bain marie sec pendant 90 min à 45 °C et mélangé toutes les 30 min. Cent µL d'acide acétique glacial sont alors ajoutés au mélange réactionnel afin d'éliminer le NaBD<sub>4</sub> en excès. Le mélange est agité vigoureusement puis 100 µL d'imidazole et 75 µL d'acide acétique anhydre sont ajoutés. Après homogénéisation, la solution est placée dans un bain marie sec pendant 30 min à 45 °C. Enfin 4 mL d'eau milliQ sont ajoutés. Après mélange pendant 1 min au vortex, 2 mL de dichlorométhane sont ajoutés et la solution est homogénéisée au vortex à nouveau pendant 1 min. La solution est alors centrifugée à 3000 g pendant 5 min et la phase inférieure est récupérée et transférée dans un nouveau tube. Quatre mL d'eau milliQ sont ajoutés à la phase prélevée puis la solution est vortexée pendant 1 min avant d'être de nouveau centrifugée à 3000 g pendant 5 min. La phase inférieure est de nouveau transférée dans un tube. Cette étape de lavage est répétée 3 fois afin d'éliminer le maximum de résidus de sels et de DMSO. Enfin l'échantillon est placé sous jet d'azote jusqu'à évaporation totale des traces résiduelles d'eau (échantillon sec). Les AAPM formés sont resuspendus dans 200 µL de dichlorométhane dans des vials avant d'être injectés et analysés sur une colonne OPTIMA-1MS avec un débit d'hélium de 2,3 mL.min<sup>-1</sup>. La pression de l'hélium est fixée à 8,8 psi et le rapport de division est fixé à 0. La température initiale du four est programmée à 80 °C pendant 2 min puis est augmentée à raison de 30 °C.min<sup>-1</sup> jusqu'à 170 °C. Une seconde montée en température est réalisée à raison de 4 °C.min<sup>-1</sup> jusqu'à une température finale de 240 °C. Cette température est maintenue pendant 20 min. L'ionisation est réalisée par impact électronique (EI, 70 eV). La température de l'injecteur est fixée à 250 °C. La température de la trappe est fixée à 150 °C et les ions cibles sont analysés dans la plage de masse de 40 à 800 m/z. Les données collectées sont traitées avec le logiciel Enhanced Chemstation Data Analyzer G1701CA.

## 9. Caractérisations physico-chimiques des EPS

### 9.1 Déterminations des grandeurs macromoléculaires par Chromatographie d'Exclusion Stérique couplée à la Diffusion de la lumière Laser Multi-Angles (CES-DLMA)

Les analyses ont été réalisées par le laboratoire Polymère, Biopolymères, Surface (PBS), UMR 6270 de l'université de Rouen. Les caractéristiques physico-chimiques des biopolymères ont été déterminées en régime dilué en utilisant la Chromatographie d'Exclusion Stérique (CES). La CES est une méthode chromatographique très utilisée dans le domaine des polymères. Elle sépare les macromolécules en fonction de leur volume hydrodynamique en solution. La colonne est composée d'un gel dont la porosité est choisie selon le polymère. Le temps d'élution correspond au temps nécessaire pour que la molécule parcoure l'ensemble de la colonne. Plus la macromolécule est de faible masse molaire et plus le temps d'élution sera long. Dans le cas de cette étude, la CES est couplée à un détecteur de Diffusion statique de la lumière Laser Multi-Angles (ou DLMA). L'intensité de la lumière diffusée est mesurée à différents angles d'observation. Un autre détecteur va mesurer l'indice de réfraction différentiel (differential refractive index : dRI). L'échantillon a été solubilisé à  $0,3 \text{ g.L}^{-1}$  dans une solution de nitrate de lithium ( $\text{LiNO}_3$ ) à 1 M, additionnée de 0,05 % d'azide de sodium ( $\text{NaN}_3$ ) pendant 1 semaine à  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ . Cinq cent  $\mu\text{L}$  d'échantillon ont ensuite été injectés après filtration sur  $0,5 \mu\text{m}$ . Le système chromatographique utilisé comprend un injecteur automatique d'échantillons (SIL-20A Shimadzu, Japon). Le solvant ( $\text{LiNO}_3$  à 0,1 M) est entraîné par une pompe HPLC (LC10Ai Shimadzu, Japon) à un débit de  $0,5 \text{ mL.min}^{-1}$  vers un filtre de  $0,5 \mu\text{m}$ . Un dégazeur en ligne (DGU-20A3 Shimadzu, Japon) est placé avant la pompe. Le produit est dirigé vers deux colonnes d'exclusion stérique disposées en série (*shodex* OHpack SB806HQ et *shodex* OHpack SB804HQ). A la sortie de la colonne, les composés sont quantifiés par un réfractomètre (RID 10A Shimadzu, Japon) suivi d'un détecteur de diffusion de la lumière multi-angles ( $\text{dn/dc}$  utilisé :  $0,147 \text{ mL.g}^{-1}$ ). Ce détecteur est constituée d'une cellule cylindrique en quartz (type K5 de  $50 \mu\text{L}$ ) au travers de laquelle circule l'éluant. Cette cellule est traversée par un faisceau laser incident. La diffusion de la lumière par les macromolécules éluées est analysée simultanément par 18 photodiodes de mesure placées autour de la cellule (Dawn HELEOS II, Wyatt Technology Corp., Ca, USA). Les données obtenues sont exploitées avec le logiciel Astra 6 permettant de tracer la dépendance angulaire selon le modèle de **Zimm (1946)**. L'exploitation des résultats permet d'accéder à l'indice de polydispersité ( $I_p$ ), aux masses molaires moyennes en nombre ( $M_n$ ) et



en masse ( $M_w$ ), et renseigne également sur le rayon de giration ( $R_g$ ) et le rayon hydrodynamique ( $R_h$ ) du polymère.

## 9.2 Etudes des propriétés rhéologiques

La rhéologie est l'étude de l'écoulement ou de la déformation des matériaux sous l'effet de contraintes mécaniques, telles que le cisaillement ou l'élongation, qui leur sont appliquées. La force appliquée par unité de surface d'un fluide correspond à la contrainte de cisaillement ( $\text{Pa}$  ou  $\text{N.m}^{-2}$ ), grandeur définie en tout point du matériau. Les techniques rhéologiques mises en œuvre dans cette étude imposent aux échantillons testés un cisaillement simple plan. Les mesures rhéologiques ont été réalisées par le laboratoire Polymère, Biopolymères, Surface (PBS) avec un rhéomètre à contrainte imposée AR2000 (TA instruments, USA) qui permet de réaliser des mesures en écoulement et en oscillation à l'aide d'une géométrie double entrefer (entrefer de  $500 \mu\text{m}$ ) composée de deux cylindres coaxiaux.

Les mesures en écoulement ont été réalisées sur des solutions aqueuses de PS à différentes concentrations (0,5, 1, 5, 10 et  $20 \text{ g.L}^{-1}$ ) additionnées de 200 ppm de  $\text{NaN}_3$  à  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  sous l'effet de cisaillement croissant comprise entre 0,1 et  $1000 \text{ s}^{-1}$ .

Pour caractériser finement les solutions complexes, la majorité des mesures a été réalisée en mode oscillatoire à  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  sur des solutions aqueuses de PS à différentes concentrations (0,5, 1, 5, 10 et  $20 \text{ g.L}^{-1}$ ) additionnées de 200 ppm de  $\text{NaN}_3$  afin d'étudier leur viscoélasticité, en mesurant les modules de conservation (ou module élastique)  $G'$  ( $\text{Pa}$ ) et de perte (ou module visqueux)  $G''$  ( $\text{Pa}$ ) dans un domaine de fréquences angulaires compris entre 0,001 et 10 Hz. La température est contrôlée par effet Peltier qui permet un ajustement rapide et précis de la température.

# Chapitre III : Résultats & Discussions

## 1. Criblage

### 1.1 Identification des souches phénotype [EPS+]

Cent soixante-six souches (150 microalgues et 16 Cyanobactéries) ont été sélectionnées parmi les 5852 souches de la RCC sur la base des critères suivants : i) couvrir un maximum la diversité phylogénétique des microalgues, ii) cibler des classes et des ordres de microalgues qui ne sont pas encore décrits pour produire des EPS, iii) sélectionner différentes espèces d'un même genre afin d'étudier la variabilité des compositions en monosaccharides au sein d'un genre donné et iv) sélectionner des souches dites à haut potentiel du fait de leurs phénotypes (production de biofilms et/ou caractère visqueux des milieux de culture). L'objectif du criblage était d'identifier des microalgues et Cyanobactéries productrices d'EPS.

Avant la réalisation du criblage, 15 mL d'inoculum de chacune des souches ont été réceptionnés au laboratoire et mis en culture dans des erlenmeyers de 50 mL complétés avec 15 mL du milieu de culture correspondant (f/2 ou PCR-S11-Red Sea). Les fioles étaient incubées à 20 °C à 150  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  et soumises à un cycle jour/nuit de 16 h/8 h pendant 7 jours. Le criblage était ensuite réalisé comme indiqué en partie II.4.2.1.

Pour que les souches soient considérées comme productrices d'EPS, elles devaient : i) être capables de se développer dans les conditions du criblage (milieu et paramètres environnementaux) et ii) produire un minimum de glucides extracellulaires après 30 jours de culture ( $T_{30}$ ) de 0,05  $\text{g.L}^{-1}$ . Ce seuil a été choisi car il correspond à la concentration limite détectable lors du dosage des oses totaux (partie II.7.4). La croissance a été évaluée à l'aide des mesures d' $A_{750\text{nm}}$  et des dosages d'ions  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  en fonction du milieu de culture (f/2 pour les microalgues et PCR-S11-Red Sea pour les Cyanobactéries). L'évaluation de ces critères a permis de classer les souches en 3 groupes : les souches phénotype [AbsC] pour leur Absence de Croissance, les souches phénotype [EPS-] pour leur non production d'EPS et les souches phénotype [EPS+] qui produisent des EPS dans les conditions du criblage. L'ensemble des résultats est présenté dans le **Tableau 13**. Les souches phénotype [EPS+] apparaissent en rouge pour plus de visibilité. Les courbes de suivi de culture du criblage pour les souches phénotype [EPS+] sont présentées sur la **Figure 38**.

**Tableau 13, partie 1** : Criblage de 166 souches de la RCC pour la détection de phénotype [EPS+].

Royaumes	Phyla	Classes	Ordres	Familles	Genres	Espèces	Numéro RCC	Croissance (A <sub>750</sub> )	Glucides extracellulaires	Phénotypes
			Chroococcales	Microcystaceae	<i>Microcystis</i>	sp.	26	+	0,00	EPS-
			Nostocales	Aphanizomenonaceae	<i>Nodularia</i>	<i>spumigena</i>	4299	+	0,00	EPS-
			Pleurocapsales	Xenococcaceae	<i>Xenococcus</i>	sp.	2703	+	0,00	EPS-
			Spirulinales	Spirulinaceae	<i>Spirulina</i>	sp.	1786	+	0,00	EPS-
				Acaryochloridaceae	<i>Acaryochloris</i>	<i>marina</i>	1983	+	0,00	EPS-
						<i>tomasi</i>	1774	+	0,00	EPS-
				Leptolyngbyaceae	<i>Leptolyngbya</i>	sp.	232	+	0,00	EPS-
				Prochloraceae	<i>Prochlorococcus</i>	sp.	269	+	0,00	EPS-
Bactérie	Cyanobactérie	Cyanophyceae			<i>Cyanobium</i>	sp.	2436	+	0,00	EPS-
			Synechococcales				2380	+	0,12*	EPS+
							1084	+	0,00	EPS-
				Synechococcaceae			2381	+	0,00	EPS-
					<i>Synechococcus</i>	sp.	2035	+	0,00	EPS-
							2368	+	0,00	EPS-
							2383	+	0,00	EPS-
							4555	+	0,00	EPS-

La classification est basée sur les données d'AlgaeBase (Guiry & Guiry, 2019) et celles de Komarek *et al.* (2014), Guillou *et al.* (2013), Yoon *et al.* (2017) et Sym & Maneveldt (2011).

☐ : aucune information disponible, + : résultat positif, - : résultat négatif, EPS+ : souches positives après criblage, phénotype EPS+, EPS- : souches négatives après criblage, phénotype EPS-, AC : phénotype absence de croissance. \*valeurs obtenues à 150 μmol photon.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> et \*\*valeurs obtenues à 300 μmol photon.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.

**Tableau 13, partie 2** : Criblage de 166 souches de la RCC pour la détection de phénotype [EPS+].

Royaumes	Phyla	Classes	Ordres	Familles	Genres	Espèces	Numéro RCC	Croissance (A <sub>750</sub> )	Glucides extracellulaires	Phénotypes	
Chromista	Cercozoa	Chlorarachniophyceae	Chlorarachniales	Chlorarachniaceae	<i>Bigelowiella</i>	<i>natans</i>	2352	+	<b>0,05*</b>	<b>EPS+</b>	
						<i>Chroomonas</i>	sp.	3436	+	0,02	EPS-
							Cryptomonadales	Hemiselmidaceae	<i>Hemiselmis</i>	sp.	2614
	Cryptophyta	Cryptophyceae	Geminigeraceae	<i>Proteomonas</i>	sp.	3072			+	0,02	EPS-
					<i>sulcata</i>	3649	-	-	AbsC		
					Pyrenomonadales	Pyrenomonadaceae	<i>Rhinomonas</i>	sp.	821	+	0,00
	<i>Rhodomonas</i>	sp.	1978	-			-	AbsC			
	Calcidiscaceae	<i>Calcidiscus</i>	<i>leptoporus</i>	1170			-	-	AbsC		
		<i>Oolithotus</i>	<i>fragilis</i>	2321	-	-	AbsC				
			Calyptosphaeraceae	<i>Calyptosphaera</i>	sp.	1180	+	<b>0,77**</b>	<b>EPS+</b>		
	<i>sphaeroidea</i>	1178			-	-	AbsC				
	Haptophyta	Coccolithophyceae	Coccolithales	Coccolithaceae	<i>Coccolithus</i>	<i>braarudii</i>	3777	-	-	AbsC	
						<i>Hymenomonas</i>	<i>coronata</i>	1337	+	<b>0,05*</b>	<b>EPS+</b>
						Hymenomonadaceae	<i>verrucosa</i>	3650	+	<b>0,05*</b>	<b>EPS+</b>
							<i>Ochrosphaera</i>	sp.	3635	+	<b>0,05*</b>

La classification est basée sur les données d'AlgaeBase (Guiry & Guiry, 2019) et celles de Komarek *et al.* (2014), Guillou *et al.* (2013), Yoon *et al.* (2017) et Sym & Maneveldt (2011).  
 ☐ : aucune information disponible, + : résultat positif, - : résultat négatif, EPS+ : souches positives après criblage, phénotype EPS+, EPS- : souches négatives après criblage, phénotype EPS-,  
 AC : phénotype absence de croissance. \*valeurs obtenues à 150  $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  et \*\*valeurs obtenues à 300  $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

**Tableau 13, partie 3** : Criblage de 166 souches de la RCC pour la détection de phénotype [EPS+].

Royaumes	Phyla	Classes	Ordres	Familles	Genres	Espèces	Numéro RCC	Croissance (A <sub>750</sub> )	Glucides extracellulaires	Phénotypes
			Coccolithales	Hymenomonadaceae	<i>Ochrosphaera</i>	sp.	2976	-	-	AbsC
							4633	+	<b>0,22*</b>	<b>EPS+</b>
					<i>Chrysotila</i>	sp.	CCAP 904/1	+	<b>0,16*</b>	<b>EPS+</b>
				Isochrysidaceae		<i>roscoffensis</i>	1395	+	0,03	EPS-
					<i>Isochrysis</i>	<i>braarudii</i>	3686	+	<b>0,06*</b>	<b>EPS+</b>
			Isochrysidales		<i>Ruttnera</i>	<i>lamellosa</i>	4061	+	<b>0,05*</b>	<b>EPS+</b>
					<i>Tisochrysis</i>	<i>lutea</i>	3699	+	0,02	EPS-
					<i>Emiliana</i>	<i>huxleyi</i>	1216	+	<b>0,07**</b>	<b>EPS+</b>
Chromista	Haptophyta	Coccolithophyceae		Noelaerhabdaceae			1217	+	0,02	EPS-
					<i>Gephyrocapsa</i>	<i>oceanica</i>	1314	-	-	AbsC
						<i>globosa</i>	739	-	-	AbsC
							1719	-	-	AbsC
							851	-	-	AbsC
							908	-	-	AbsC
			Phaeocystales	Phaeocystaceae	<i>Phaeocystis</i>		925	-	-	AbsC
						sp.	940	-	-	AbsC
							2055	-	-	AbsC
							3539	-	-	AbsC

La classification est basée sur les données d'AlgaeBase (Guiry & Guiry, 2019) et celles de Komarek *et al.* (2014), Guillou *et al.* (2013), Yoon *et al.* (2017) et Sym & Maneveldt (2011).  
 ☐ : aucune information disponible, + : résultat positif, - : résultat négatif, EPS+ : souches positives après criblage, phénotype EPS+, EPS- : souches négatives après criblage, phénotype EPS-,  
 AC : phénotype absence de croissance. \*valeurs obtenues à 150  $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  et \*\*valeurs obtenues à 300  $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

**Tableau 13, partie 4** : Criblage de 166 souches de la RCC pour la détection de phénotype [EPS+].

Royaumes	Phyla	Classes	Ordres	Familles	Genres	Espèces	Numéro RCC	Croissance (A <sub>750</sub> )	Glucides extracellulaires	Phénotypes
					<i>Prymnesium</i>	<i>parvum</i>	3426	+	<b>0,12*</b>	<b>EPS+</b>
			Prymnesiales	Prymnesiaceae	<i>Imantonia</i>	<i>rotunda</i>	1342	+	0,04	EPS-
					<i>Haptolina</i>	<i>hirta</i>	3421	-	-	AbsC
		Coccolithophyceae								
			Prymnesiales	Chrysochromulinaceae	<i>Chrysochromulina</i>	<i>camella</i>	1186	-	-	AbsC
			Zygodiscales	Pontosphaeraceae	<i>Scyphosphaera</i>	<i>apsteinii</i>	1456	-	-	AbsC
							3704	+	<b>0,05*</b>	<b>EPS+</b>
						sp.	3514	+	<b>0,29**</b>	<b>EPS+</b>
					<i>Diacronema</i>	<i>lutheri</i>	1537	+	0,01	EPS-
Chromista	Haptophyta					<i>viridis</i>	3459	+	0,02	EPS-
					<i>Exanthemachrysis</i>	sp.	1536	+	<b>0,06*</b>	<b>EPS+</b>
							1544	+	<b>0,10*</b>	<b>EPS+</b>
		Pavlovophyceae	Pavloales	Pavlovaceae		<i>enoriae</i>	1525	+	<b>0,05*</b>	<b>EPS+</b>
						<i>gyrans</i>	1545	+	<b>0,05*</b>	<b>EPS+</b>
					<i>Pavlova</i>		4037	+	<b>0,09*</b>	<b>EPS+</b>
						sp.	4120	+	<b>0,08*</b>	<b>EPS+</b>
							4070	+	<b>0,07*</b>	<b>EPS+</b>
							3438	+	<b>0,39*</b>	<b>EPS+</b>

La classification est basée sur les données d'AlgaeBase (Guiry & Guiry, 2019) et celles de Komarek *et al.* (2014), Guillou *et al.* (2013), Yoon *et al.* (2017) et Sym & Maneveldt (2011).  
 ☐ : aucune information disponible, + : résultat positif, - : résultat négatif, EPS+ : souches positives après criblage, phénotype EPS+, EPS- : souches négatives après criblage, phénotype EPS-, AC : phénotype absence de croissance. \*valeurs obtenues à 150 µmol photon.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> et \*\*valeurs obtenues à 300 µmol photon.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.

**Tableau 13, partie 5** : Criblage de 166 souches de la RCC pour la détection de phénotype [EPS+].

Royaumes	Phyla	Classes	Ordres	Familles	Genres	Espèces	Numéro RCC	Croissance (A <sub>750</sub> )	Glucides extracellulaires	Phénotypes
Chromista	Haptophyta	Pavlovophyceae	Pavlovales	Pavlovaceae	<i>Rebecca</i>	sp.	1528	+	0,05**	EPS+
		[Hatched pattern]						6688	+	0,10*
	Miozoa	Dinophyceae	Gonyaulacales	Ostreopsidaceae	<i>Alexandrium</i>	<i>minutum</i>	1490	+	0,01	EPS-
				Brachidiniaceae	<i>Karenia</i>	<i>brevis</i>	4635	-	-	AbsC
			Gymnodiniales	Gymnodiniaceae	<i>Amphidinium</i>	<i>carterae</i>	1522	+	0,05**	EPS+
					<i>Cochlodinium</i>	<i>polykrikoïdes</i>	4634	-	-	AbsC
			Peridiniales	Heterocapsaceae	<i>Lepidodinium</i>	<i>chlorophorum</i>	1489	-	-	AbsC
					<i>Heterocapsa</i>	sp.	3466	+	0,01	EPS-
			Prorocentrales	Prorocentraceae	<i>Biecheleriopsis</i>	sp.	2616	-	-	AbsC
					<i>Prorocentrum</i>	<i>micans</i>	1517	-	-	AbsC
			Suessiales	Suessiaceae	<i>Biecheleriopsis</i>	sp.	3656	-	-	AbsC
					<i>Pelagodinium</i>	sp.	3003	-	-	AbsC
					<i>Symbiodinium</i>	<i>kawagutii</i>	4019	+	0,02	EPS-
					<i>Symbiodinium</i>	<i>voratum</i>	1521	+	0,03	EPS-
			Thoracosphaerales	Thoracosphaeraceae	<i>Thoracosphaera</i>	<i>heimii</i>	1512	+	0,01	EPS-
					<i>Scrippsiella</i>	<i>trochoïdea</i>	1515	+	0,01	EPS-

La classification est basée sur les données d'AlgaeBase (Guiry & Guiry, 2019) et celles de Komarek *et al.* (2014), Guillou *et al.* (2013), Yoon *et al.* (2017) et Sym & Maneveldt (2011). [Hatched pattern] : aucune information disponible, + : résultat positif, - : résultat négatif, EPS+ : souches positives après criblage, phénotype EPS+, EPS- : souches négatives après criblage, phénotype EPS-, AC : phénotype absence de croissance. \*valeurs obtenues à 150  $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  et \*\*valeurs obtenues à 300  $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

**Tableau 13, partie 6** : Criblage de 166 souches de la RCC pour la détection de phénotype [EPS+].

Royaumes	Phyla	Classes	Ordres	Familles	Genres	Espèces	Numéro RCC	Croissance (A <sub>750</sub> )	Glucides extracellulaires	Phénotypes		
Chromista	Ochrophyta	Bacillariophyceae	Bacillariales	Bacillariaceae	<i>Cylindrotheca</i>	sp.	2608	-	-	AbsC		
					<i>Nitzschia</i>	sp.	2638	-	-	AbsC		
			Fragilariales					2598	+	0,00	EPS-	
		Coscinodiscophyceae	Rhizosoleniales	Rhizosoleniaceae	Rhizosoleniales	Rhizosoleniaceae	<i>Guinardia</i>	<i>flaccida</i>	3093	-	-	AbsC
							Chrysophyceae	Chromulinales	Chromulinaceae	<i>Ochromonas</i>	sp.	2350
		Chrysamoebaceae	<i>Chrysamoeba</i>	sp.	377	-			-	AbsC		
		Dictyochophyceae	Rhizochromulinales	Rhizochromulinaceae	Rhizochromulinales	Rhizochromulinaceae	<i>Pseudochattonella</i>	<i>verruculosa</i>	1082	-	-	AbsC
							<i>Rhizochromulina</i>	sp.	4438	-	-	AbsC
		Mediophyceae	Thalassiosirales	Thalassiosiraceae	Thalassiosirales	Thalassiosiraceae	<i>Chaetoceros</i>	sp.	2564	-	-	AbsC
							<i>Papiliocellulus</i>	sp.	2624	+	0,00	EPS-
							<i>Minutocellulus</i>	sp.	1863	-	-	AbsC
							<i>Odontella</i>	sp.	2558	-	-	AbsC
							<i>Ditylum</i>	<i>brightwellii</i>	775	-	-	AbsC
							<i>Skeletonema</i>	sp.	2932	-	-	AbsC
							<i>Minidiscus</i>	<i>trioculatus</i>	4657	-	-	AbsC
		<i>Thalassiosira</i>	sp.	1714	-	-	AbsC					
		<i>Thalassiosira</i>	<i>weissflogii</i>	76	-	-	AbsC					

La classification est basée sur les données d'AlgaeBase (Guiry & Guiry, 2019) et celles de Komarek *et al.* (2014), Guillou *et al.* (2013), Yoon *et al.* (2017) et Sym & Maneveldt (2011).  
 ☐ : aucune information disponible, + : résultat positif, - : résultat négatif, EPS+ : souches positives après criblage, phénotype EPS+, EPS- : souches négatives après criblage, phénotype EPS-, AC : phénotype absence de croissance. \*valeurs obtenues à 150 µmol photon.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> et \*\*valeurs obtenues à 300 µmol photon.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.



**Tableau 13, partie 7 :** Criblage de 166 souches de la RCC pour la détection de phénotype [EPS+].

Royaumes	Phyla	Classes	Ordres	Familles	Genres	Espèces	Numéro RCC	Croissance (A <sub>750</sub> )	Glucides extracellulaires	Phénotypes			
Chromista	Ochrophyta	Pelagophyceae	Pelagomonadales	Pelagomonadaceae	<i>Aureococcus</i>	<i>anophagefferens</i>	96	-	-	AbsC			
							4094	-	-	AbsC			
							3069	+	0,10**	EPS+			
			Sarcinochrysidales	Sarcinochrysidaceae	<i>Andersenia</i>	<i>nodulosa</i>	4631	+	0,01	EPS-			
							97	-	-	AbsC			
			[No information available]							2696	+	0,01	EPS-
			Phaeothamniophyceae	Aurearenales	Aurearenaceae	<i>Aurearena</i>	<i>cruciata</i>	4621	+	0,01	EPS-		
								3707	+	0,11*	EPS+		
			Pinguiphyceae	Pinguiochrysidales	Pinguiochrysidaceae	<i>Glossomastix</i>	sp.	3688	+	0,10**	EPS+		
								3685	+	0,06*	EPS+		
								1196	+	0,01	EPS-		
								4470	+	0,07**	EPS+		
			Raphidophyceae	Chattonellales	Fibrocapsaceae	<i>Heterosigma</i>	<i>akashino</i>	1502	+	0,01	EPS-		
								1501	-	-	AbsC		
			Synchromophyceae	Synchromales	Synchromaceae	<i>Guanchochroma</i>	<i>wildpretii</i>	3390	-	-	AbsC		
[No information available]							CC 19	+	0,13*	EPS+			

La classification est basée sur les données d'AlgaeBase (Guiry & Guiry, 2019) et celles de Komarek *et al.* (2014), Guillou *et al.* (2013), Yoon *et al.* (2017) et Sym & Maneveldt (2011).  
 ☐ : aucune information disponible, + : résultat positif, - : résultat négatif, EPS+ : souches positives après criblage, phénotype EPS+, EPS- : souches négatives après criblage, phénotype EPS-, AC : phénotype absence de croissance. \*valeurs obtenues à 150  $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  et \*\*valeurs obtenues à 300  $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

**Tableau 13, partie 8** : Criblage de 166 souches de la RCC pour la détection de phénotype [EPS+].

Royaumes	Phyla	Classes	Ordres	Familles	Genres	Espèces	Numéro RCC	Croissance (A <sub>750</sub> )	Glucides extracellulaires	Phénotypes
						<i>chui</i>	128	+	0,05*	EPS+
						<i>globosa</i>	1564	+	0,05*	EPS+
		Chlorodendrophyceae	Chlorodendrales	Chlorodendraceae	<i>Tetraselmis</i>	<i>rubens</i>	133	+	0,05*	EPS+
						<i>striata</i>	130	+	0,02	EPS-
						sp.	4435	+	0,21**	EPS+
							119	+	0,03	EPS-
Plantae	Chlorophyta			Chlamydomonadaceae	<i>Chlamydomonas</i>	sp.	3443	+	0,01	EPS-
		Chlorophyceae	Chlamydomonadales	Dunaliellaceae	<i>Dunaliella</i>	sp.	5	+	0,06**	EPS+
						<i>tertiolecta</i>	6	+	0,02	EPS-
				Bathycoccaceae	<i>Bathycoccus</i>	<i>prasinos</i>	4222	-	-	AbsC
		Mamiellophyceae	Mamiellales	Mamiellaceae	<i>Micromonas</i>	<i>commoda</i>	827	+	0,01	EPS-
					<i>Ostreococcus</i>	<i>tauri</i>	1108	+	0,01	EPS-
		Nephrophyceae	Nephroselmidales	Nephroselmidaceae	<i>Nephroselmis</i>	sp.	1805	+	0,03	EPS-

La classification est basée sur les données d'AlgaeBase (Guiry & Guiry, 2019) et celles de Komarek *et al.* (2014), Guillou *et al.* (2013), Yoon *et al.* (2017) et Sym & Maneveldt (2011).

☐ : aucune information disponible, + : résultat positif, - : résultat négatif, EPS+ : souches positives après criblage, phénotype EPS+, EPS- : souches négatives après criblage, phénotype EPS-, AC : phénotype absence de croissance. \*valeurs obtenues à 150  $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  et \*\*valeurs obtenues à 300  $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

**Tableau 13, partie 9** : Criblage de 166 souches de la RCC pour la détection de phénotype [EPS+].

Royaumes	Phyla	Classes	Ordres	Familles	Genres	Espèces	Numéro RCC	Croissance (A <sub>750</sub> )	Glucides extracellulaires	Phénotypes		
Plantae	Chlorophyta	Palmophyllophyceae	Prasinococcales	Prasinococcaceae	<i>Prasinococcus</i>	sp.	2684	+	<b>0,07*</b>	<b>EPS+</b>		
					<i>Prasinoderma</i>	sp.	2686	+	0,02	EPS-		
		Picocystophyceae	Picocystales	Picocystaceae	<i>Picocystis</i>	<i>salinarum</i>	3402	+	0,02	EPS-		
							2336	+	0,01	EPS-		
		Pyramimonadophyceae	Pseudoscourfieldiales	Pycnococcaceae	<i>Pycnococcus</i>	<i>provasolii</i>	3439	+	0,01	EPS-		
			Pyramimonadales	Pyramimonadaceae	<i>Pyramimonas</i>	sp.	4212	-	-	AbsC		
		Chlorellales	Trebouxiophyceae	Chlorellaceae	<i>Chlorella</i>	sp.	2340	+	<b>0,05*</b>	<b>EPS+</b>		
					<i>Nannochloris</i>	sp.	3644	+	0,00	EPS-		
					<i>Picochlorum</i>	sp.	3065	+	0,00	EPS-		
					<i>Coccomyxa</i>	sp.	903	+	<b>0,05*</b>	<b>EPS+</b>		
									3440	-	-	AbsC
		Rhodophyta	Stylonematophyceae	Stylonematales	Stylonemataceae	<i>Porphyridium</i>	sp.	4628	+	<b>0,23*</b>	<b>EPS+</b>	
						<i>Rhodella</i>	<i>maculata</i>	655	+	<b>0,06*</b>	<b>EPS+</b>	
<i>Chroodactylon</i>	<i>ramnosum</i>					654	+	0,01	EPS-			
<i>Stylonema</i>	sp.					2964	+	0,00	EPS-			

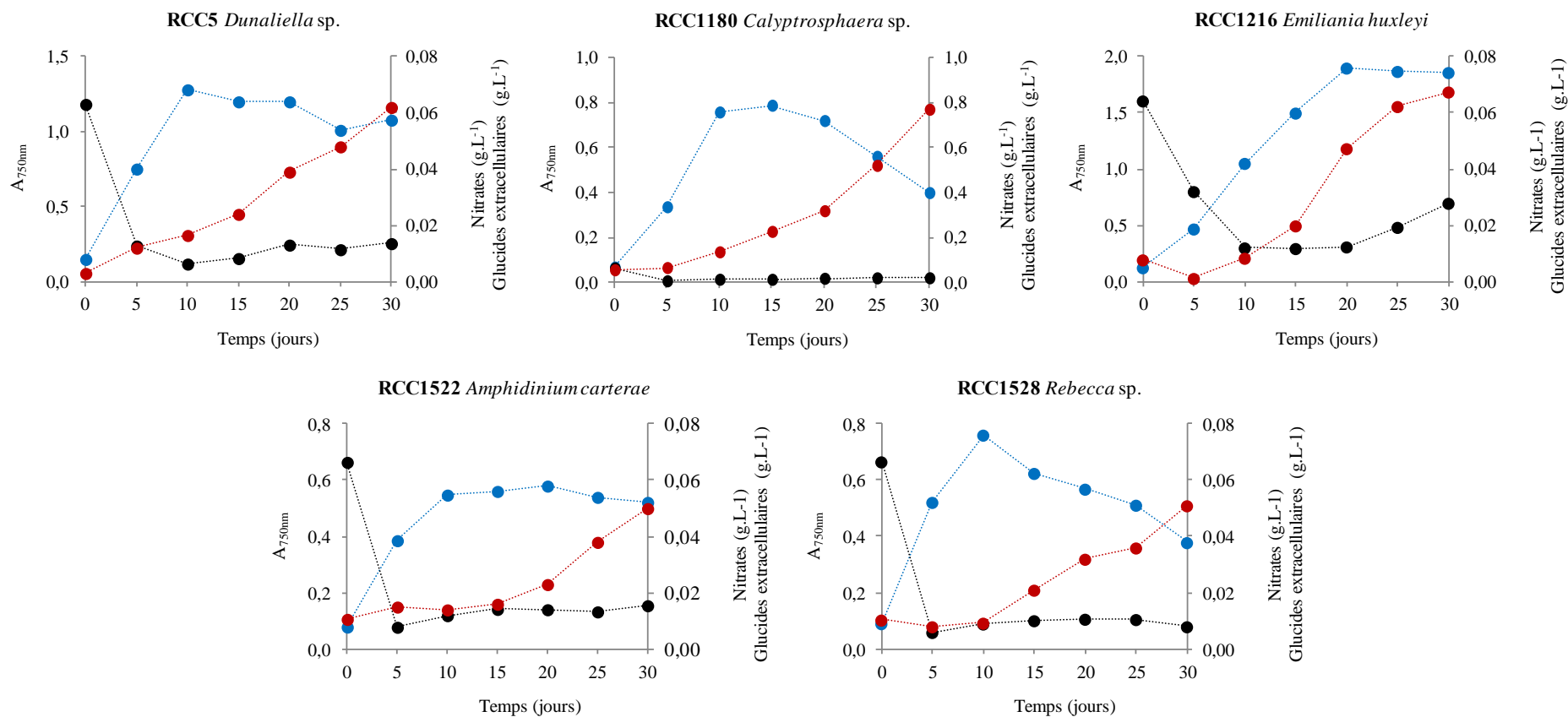
La classification est basée sur les données d'AlgaeBase (Guiry & Guiry, 2019) et celles de Komarek *et al.* (2014), Guillou *et al.* (2013), Yoon *et al.* (2017) et Sym & Maneveldt (2011).

☐ : aucune information disponible, + : résultat positif, - : résultat négatif, EPS+ : souches positives après criblage, phénotype EPS+, EPS- : souches négatives après criblage, phénotype EPS-, AC : phénotype absence de croissance. \*valeurs obtenues à 150 μmol photon.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> et \*\*valeurs obtenues à 300 μmol photon.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.

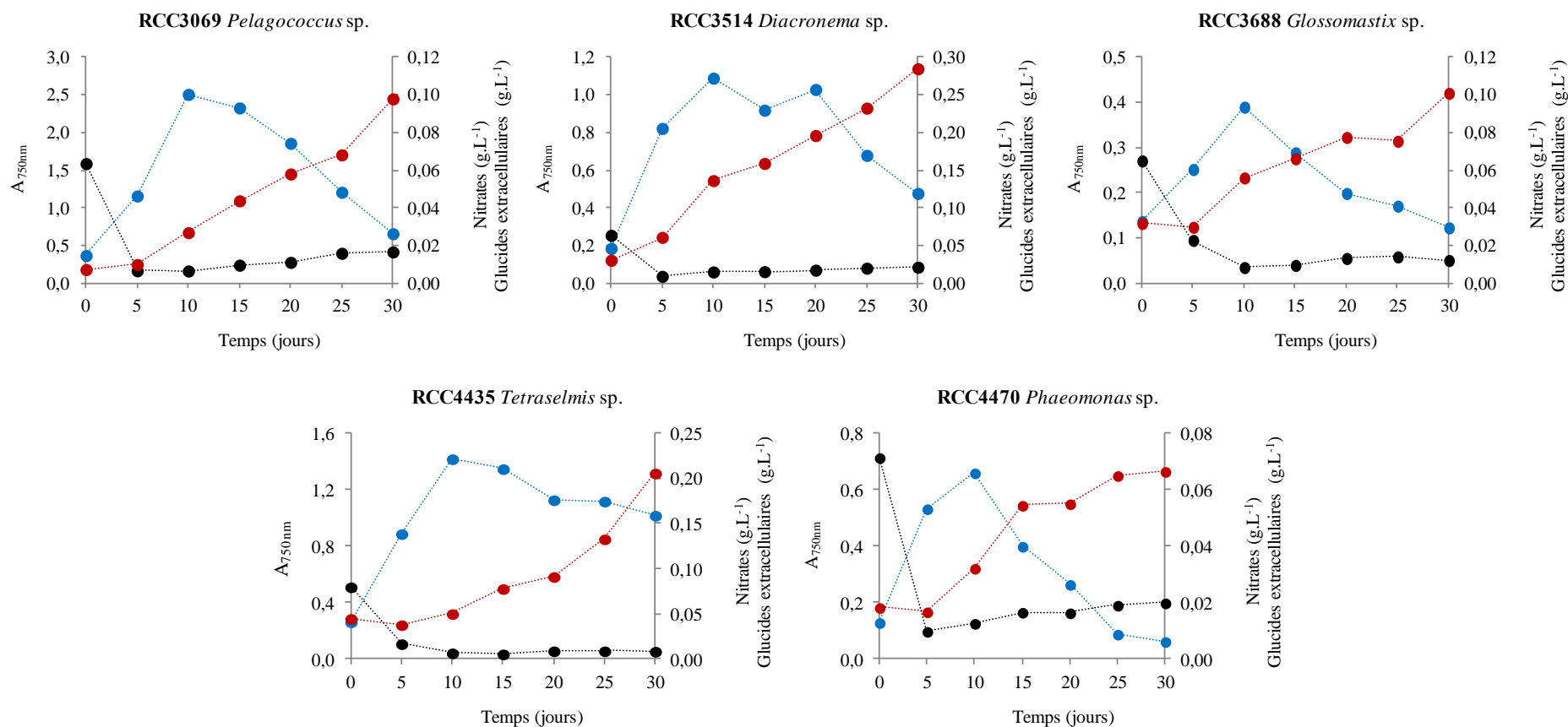
**Tableau 13, partie 10** : Criblage de 166 souches de la RCC pour la détection de phénotype [EPS+].

Royaumes	Phyla	Classes	Ordres	Familles	Genres	Espèces	Numéro RCC	Croissance ( $A_{750}$ )	Glucides extracellulaires	Phénotypes
							3452	+	0,06*	EPS+
							A13 880	+	0,08*	EPS+
							CC 21	+	0,05*	EPS+
							CC 76	+	0,05*	EPS+
							3641	+	0,01	EPS-
							4078	+	0,01	EPS-
							18/1	+	0,00	EPS-
							AST 713	+	0,01	EPS-
							CC 14	+	0,01	EPS-
							CC 20	+	0,02	EPS-
							3448	-	-	AbsC
							3473	-	-	AbsC
							AST 714	-	-	AbsC
							JAP PR7	-	-	AbsC
							JAP PR8	-	-	AbsC
							KO 334	-	-	AbsC
OSH 51	-	-	AbsC							

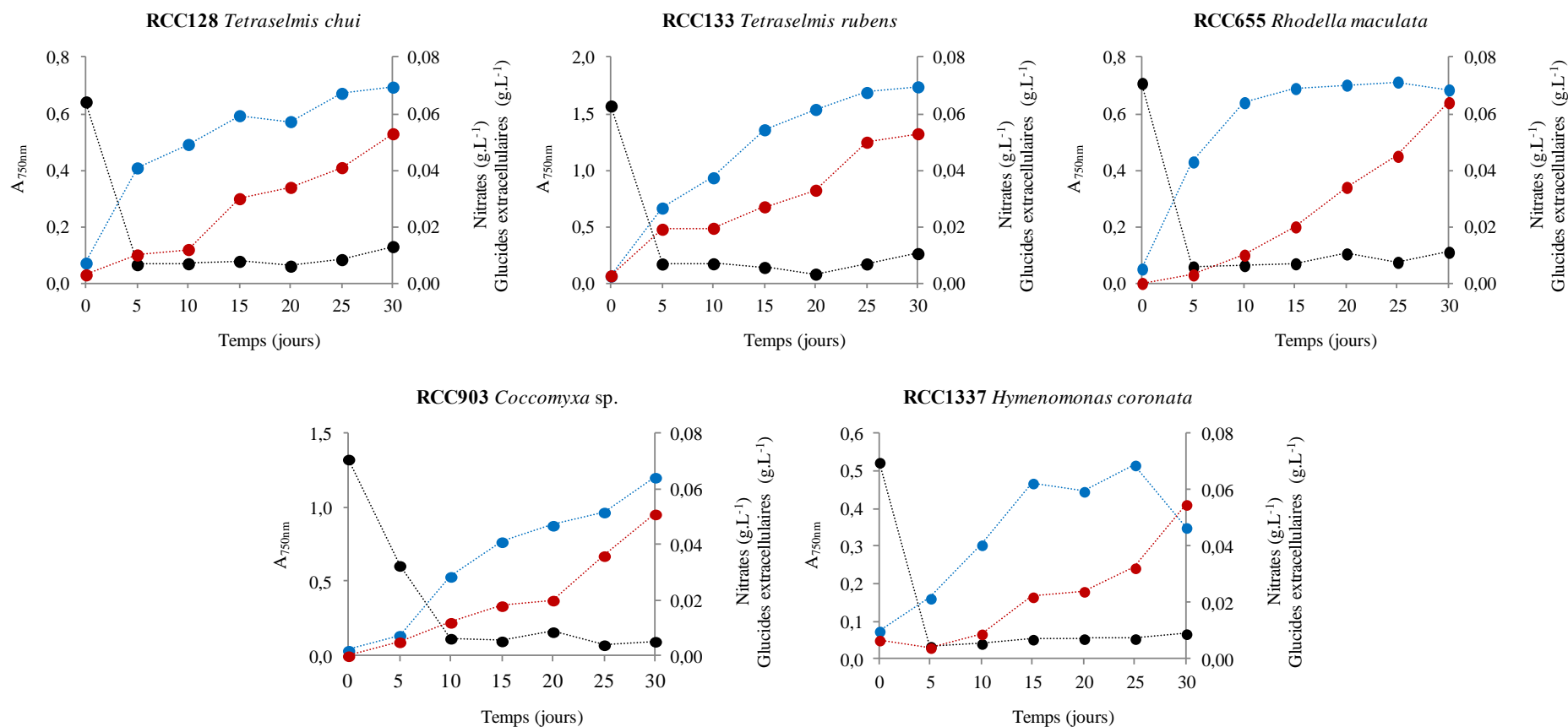
La classification est basée sur les données d'AlgaeBase (Guiry & Guiry, 2019) et celles de Komarek *et al.* (2014), Guillou *et al.* (2013), Yoon *et al.* (2017) et Sym & Maneveldt (2011).  
 : aucune information disponible, + : résultat positif, - : résultat négatif, EPS+ : souches positives après criblage, phénotype EPS+, EPS- : souches négatives après criblage, phénotype EPS-, AC : phénotype absence de croissance. \*valeurs obtenues à 150  $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  et \*\*valeurs obtenues à 300  $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .



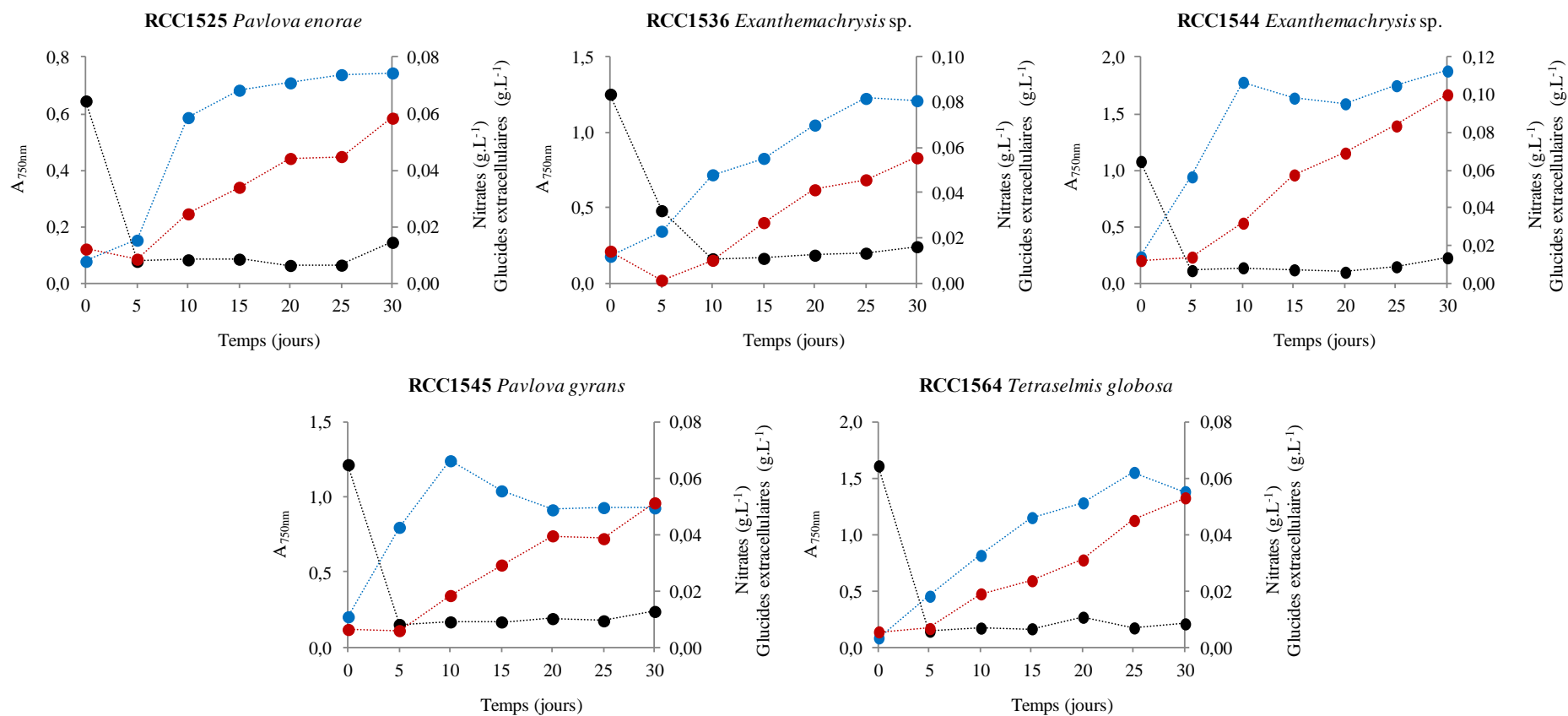
**Figure 38, partie 1** : Mesures des absorbances à  $\lambda=750$  nm (●), des ions nitrates (●) et des glucides extracellulaires (●) effectuées lors du criblage sur les cultures en milieu f/2 des souches [EPS<sup>+</sup>] (cycle jour/nuit de 16 h/8 h et une irradiance de 300  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ).



**Figure 38, partie 2 :** Mesures des absorbances à  $\lambda=750$  nm (●), des ions nitrates (●) et des glucides extracellulaires (●) effectuées lors du criblage sur les cultures en milieu f/2 des souches [EPS<sup>+</sup>] (cycle jour/nuit de 16 h/8 h et une irradiance de 300  $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

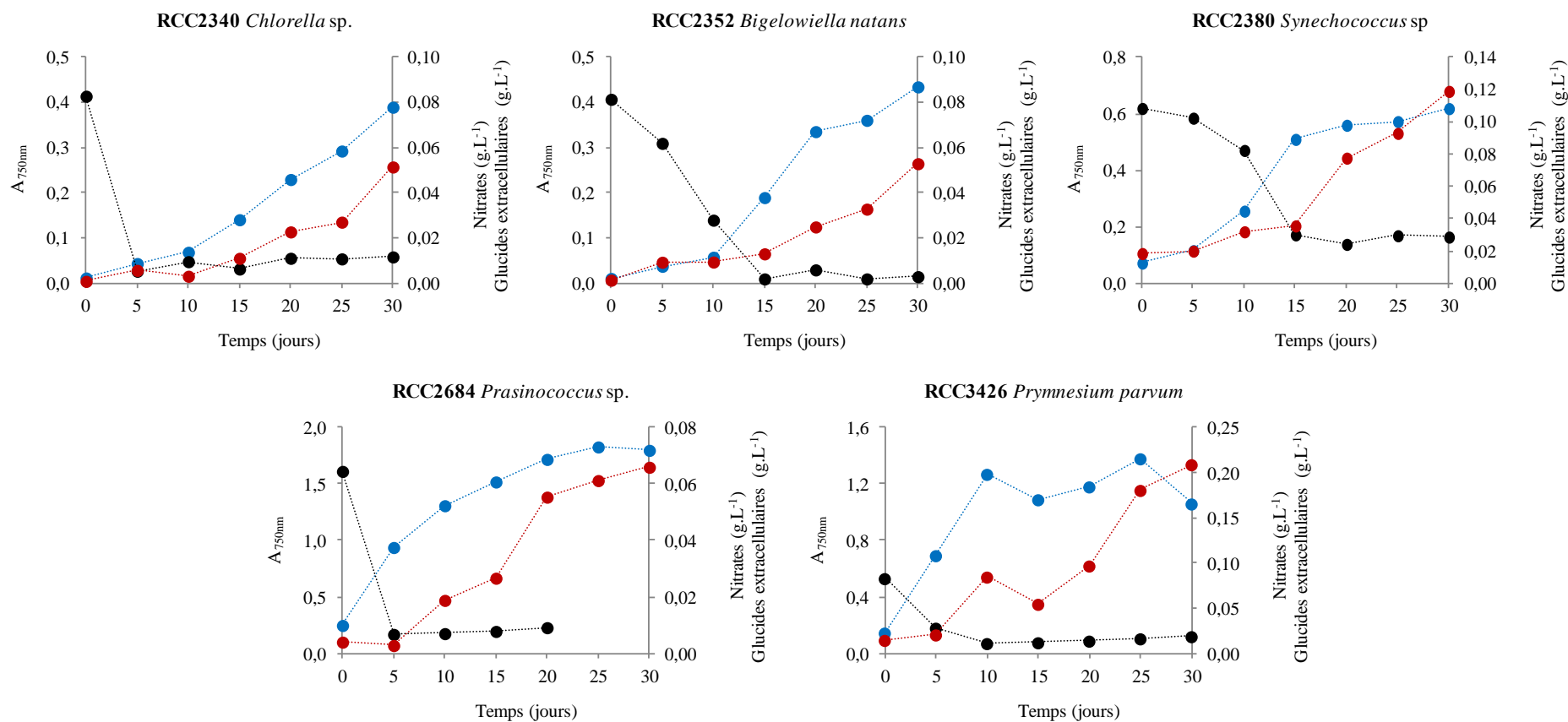


**Figure 38, partie 3** : Mesures des absorbances à  $\lambda=750$  nm (●), des ions nitrates (●) et des glucides extracellulaires (●) effectuées lors du criblage sur les cultures en milieu f/2 des souches [EPS<sup>+</sup>] (cycle jour/nuit de 16 h/8 h et une irradiance de 150  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ).

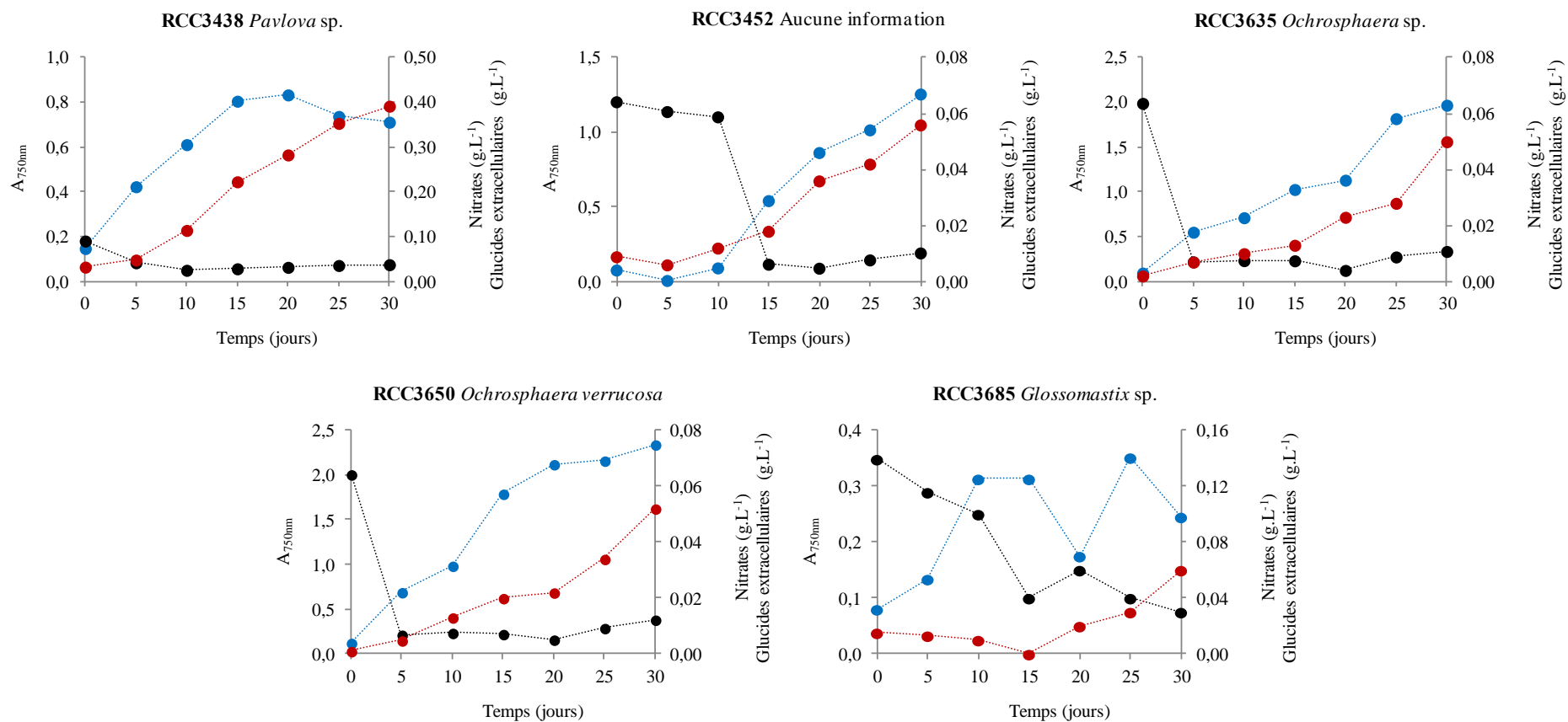


**Figure 38, partie 4 :** Mesures des absorbances à  $\lambda=750$  nm (●), des ions nitrates (●) et des glucides extracellulaires (●) effectuées lors du criblage sur les cultures en milieu f/2 des souches [EPS<sup>+</sup>] (cycle jour/nuit de 16 h/8 h et une irradiance de  $150 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ).

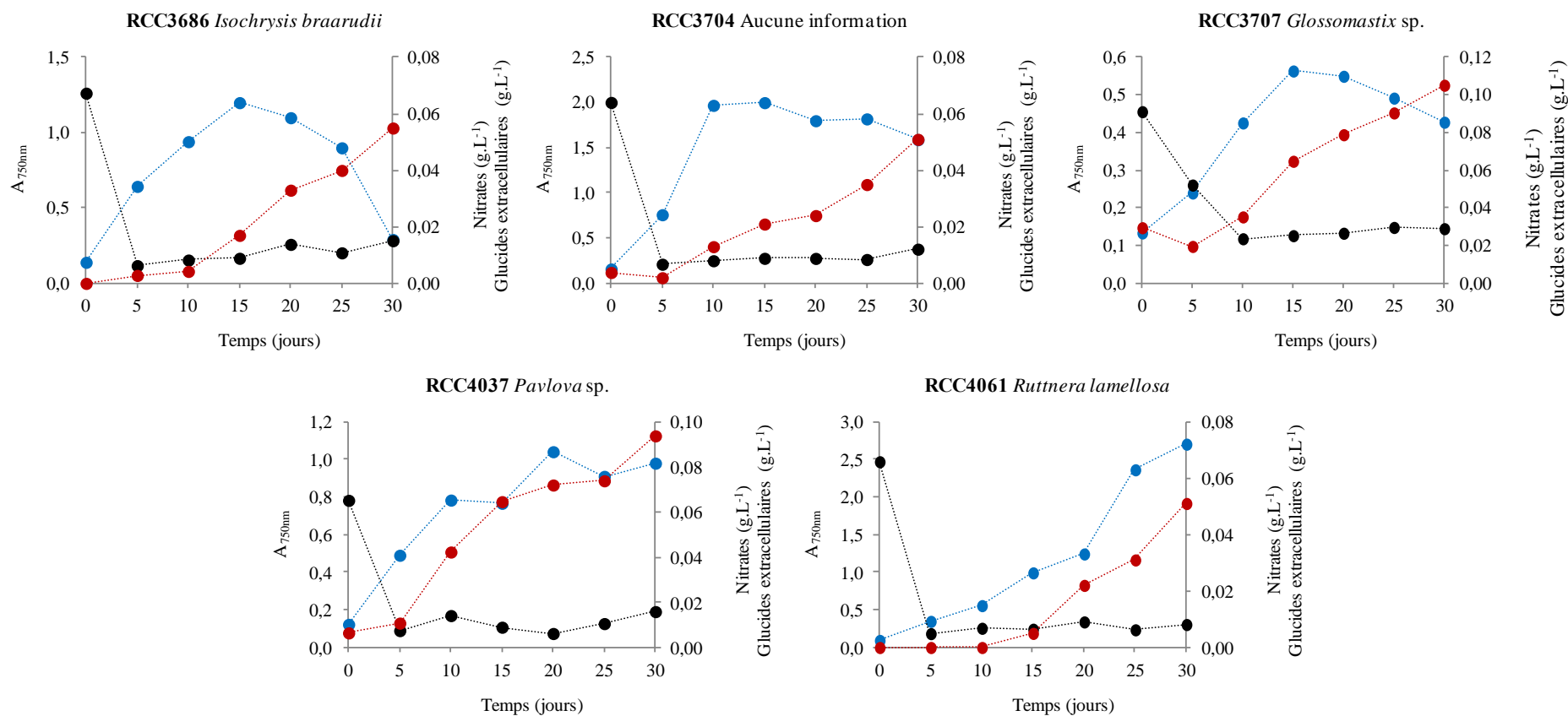




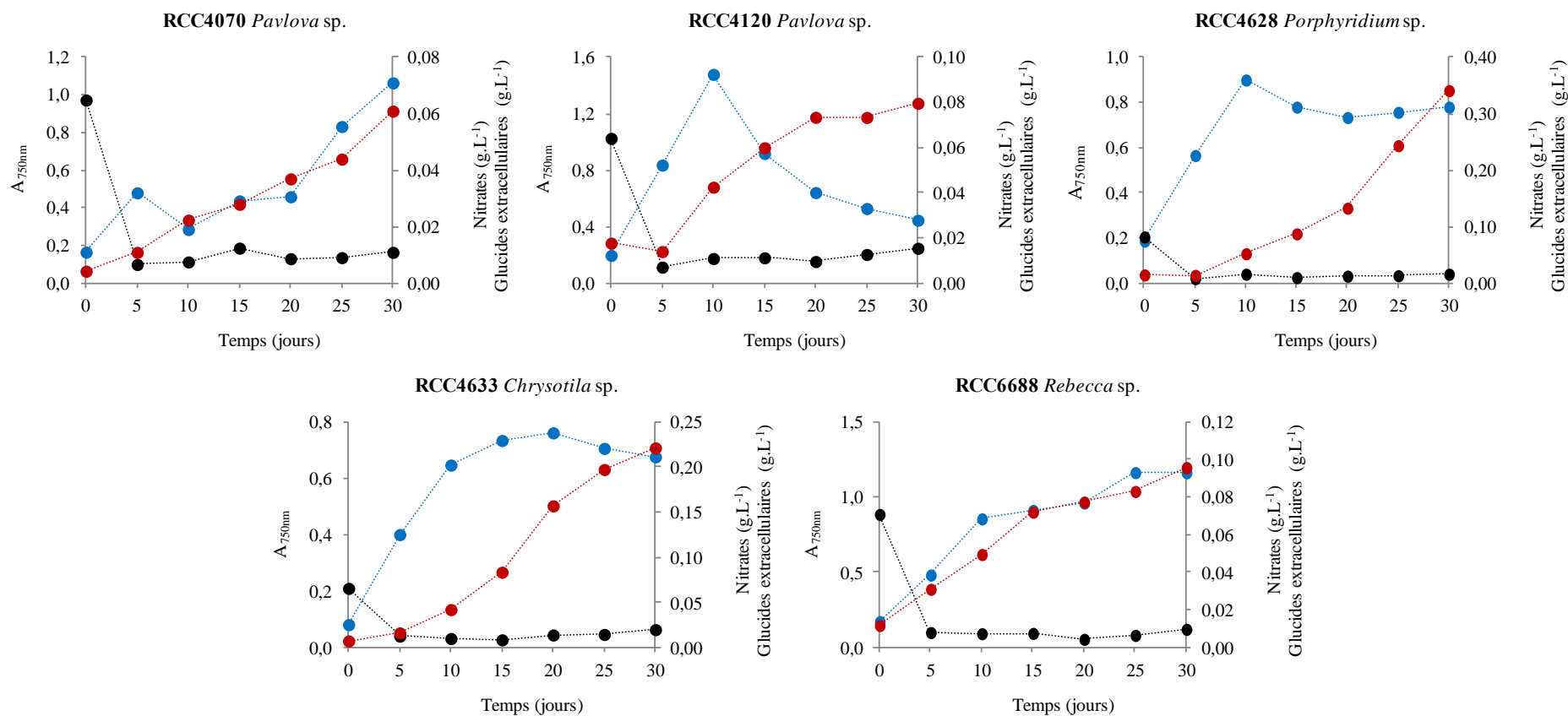
**Figure 38, partie 5 :** Mesures des absorbances à  $\lambda=750$  nm ( $\bullet$ ), des ions nitrates ( $\bullet$ ) et des glucides extracellulaires ( $\bullet$ ) effectuées lors du criblage sur les cultures en milieu f/2 des souches [EPS<sup>+</sup>] (cycle jour/nuit de 16 h/8 h et une irradiance de  $150 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).



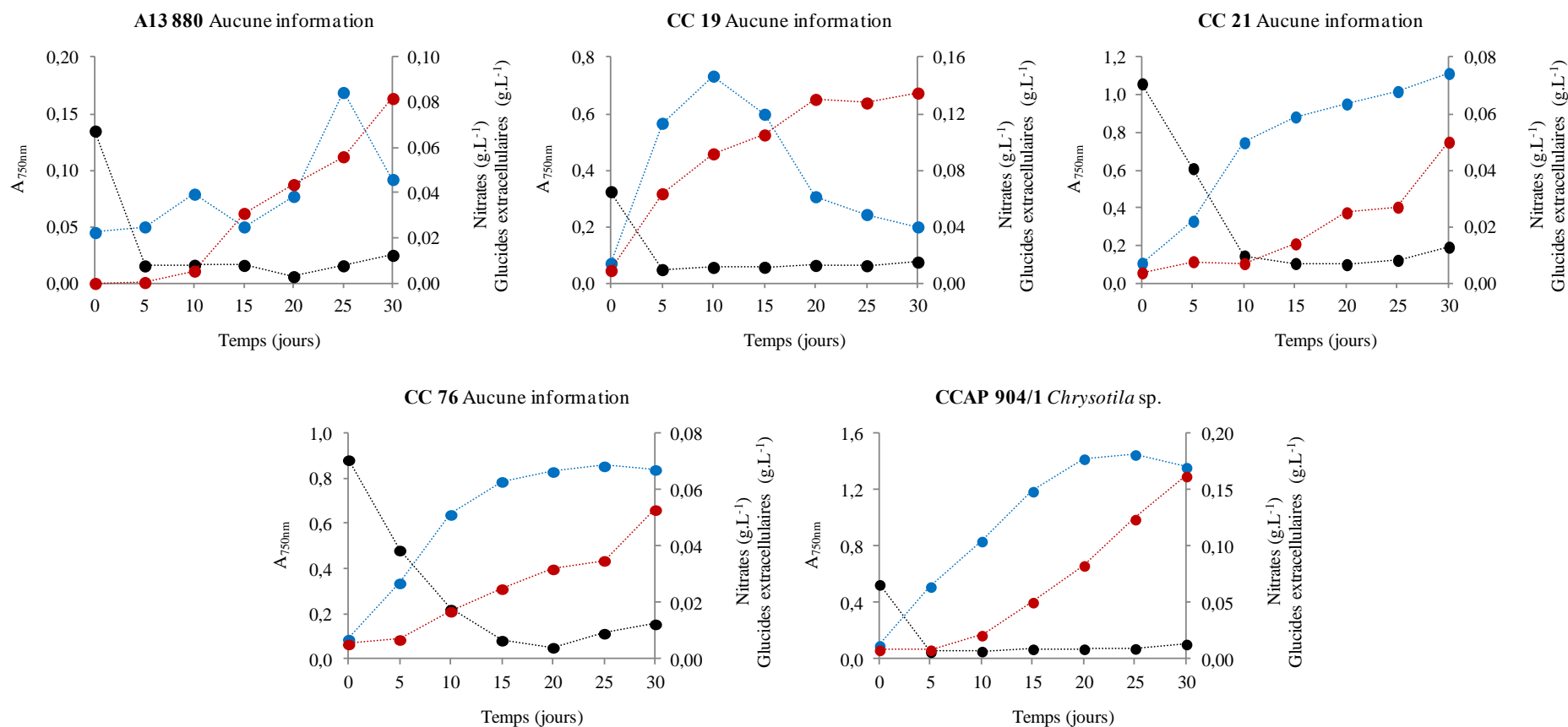
**Figure 38, partie 6 :** Mesures des absorbances à  $\lambda=750$  nm (●), des ions nitrates (●) et des glucides extracellulaires (●) effectuées lors du criblage sur les cultures en milieu f/2 des souches [EPS<sup>+</sup>] (cycle jour/nuit de 16 h/8 h et une irradiance de  $150 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ).



**Figure 38, partie 7 :** Mesures des absorbances à  $\lambda=750$  nm (●), des ions nitrates (●) et des glucides extracellulaires (●) effectuées lors du criblage sur les cultures en milieu f/2 des souches [EPS<sup>+</sup>] (cycle jour/nuit de 16 h/8 h et une irradiance de  $150 \mu mol photons.m^{-2}.s^{-1}$ ).



**Figure 38, partie 8 :** Mesures des absorbances à  $\lambda=750$  nm ( $\bullet$ ), des ions nitrates ( $\bullet$ ) et des glucides extracellulaires ( $\bullet$ ) effectuées lors du criblage sur les cultures en milieu f/2 des souches [EPS<sup>+</sup>] (cycle jour/nuit de 16 h/8 h et une irradiance de  $150 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ).



**Figure 38, partie 9** : Mesures des absorbances à  $\lambda=750$  nm (●), des ions nitrates (●) et des glucides extracellulaires (●) effectuées lors du criblage sur les cultures en milieu f/2 des souches [EPS<sup>+</sup>] (cycle jour/nuit de 16 h/8 h et une irradiance de 150  $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

Les souches du groupe de phénotype [AbsC] correspondent à celles pour lesquelles aucune croissance n'a pu être observée dans les conditions du criblage. Il est constitué de 60 souches réparties dans 6 phyla, 13 classes, 28 ordres, 35 familles et 42 genres. Chaque microalgue et Cyanobactérie possédant des paramètres de culture plus ou moins spécifiques, plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour justifier cette absence de croissance même si les souches sélectionnées étaient théoriquement à même de se développer dans les conditions du criblage. La première serait la composition des milieux de culture utilisés pour le criblage (f/2 et PCR-S11-Red Sea). Si ces derniers ont été choisis comme couvrant les besoins d'un maximum d'espèces lors de leur culture en photoautotrophie, certains nutriments essentiels pour la croissance de certaines espèces plus exigeantes peuvent être absents. Ainsi le silicium qui est un élément obligatoire pour le bon développement des Bacilliarophyta (**Martin-Jézéquel *et al.*, 2000**) n'est pas présent dans le milieu f/2. Cette hypothèse est corroborée par le fait que la plupart des diatomées de cette étude se retrouvent dans le groupe [AbsC]. Seules exceptions, les souches RCC2598 et RCC2624 sont présentes dans le groupe [EPS-]. Outre les minéraux essentiels, la salinité du milieu (28,13 g.L<sup>-1</sup> de NaCl pour le milieu f/2 et 33,33 g.L<sup>-1</sup> de Red Sea Salt pour le milieu PCR-S11-Red Sea) peut également être mise en cause. Enfin, les paramètres environnementaux peuvent également être à l'origine de cette absence de croissance. En effet, l'agitation orbitale fixée à 120 rpm occasionne un stress pour les souches benthiques qui se développent en étant fixées sur des supports, contrairement aux souches pélagiques soumises aux courants marins et donc beaucoup plus tolérantes au cisaillement (**Cahoon, 1999**). Ainsi, l'agitation fixée à 120 rpm pendant le criblage pourrait avoir nuit à leur croissance. De même, les intensités lumineuses (150 et 300  $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) et la température (20 °C) sont aussi des facteurs environnementaux pouvant entraîner l'absence de croissance pour certaines souches. Malgré le potentiel phénotypique de ces souches elles n'ont pas fait l'objet d'essais de mise en culture supplémentaires au cours de cette étude au cours de laquelle l'intérêt s'est porté aux souches de phénotype [EPS+].

Le groupe de phénotype [EPS-] comprend les souches pour lesquelles des croissances ont été mesurées mais présentant des quantités de glucides extracellulaires totaux mesurées dans le milieu extracellulaire (surnageant de culture à T<sub>30</sub>) inférieures à la valeur seuil de 0,05 g.L<sup>-1</sup>. Ce groupe représente 46 microalgues et 15 Cyanobactéries réparties en 7 phyla, 20 classes, 29 ordres, 34 familles et 42 genres. Chez de nombreuses souches, la production d'EPS s'effectue suite à un « stress » (**Markou & Nerantzis, 2013**) et peut être initiée lorsque les microalgues sont soumises à une carence nutritive (azote et phosphore notamment) (**Arad**

*et al.*, 1992 ; **De Philippis & Vincenzini, 1998**). En effet, la production d'EPS augmente de manière significative pour de nombreuses microalgues et Cyanobactéries lorsqu'elles sont en état de carence azotée et/ou phosphatée et entrent en phase stationnaire (e.g. *Porphyridium aerugineum*, *Porphyridium marinum* (**Ramus, 1972 ; Soanen et al., 2016**), *Anabaena* sp. (**Moreno et al., 1998**), *Cyanothece* sp. (**Reddy et al., 1996**), *Rhodella violacea*, *Rhodella reticulata* (**Arad et al., 1992 ; Villay et al., 2013**), *Flintiella sanguinaria* (**Gaignard et al., 2018**), *Nostoc calcicola* (**Flaibani et al., 1989**), *Phormidium* (**Fattom & Shilo, 1984, 1985**) et plusieurs espèces de *Cyanothece* (**De Philippis et al., 1993, 1998**). Néanmoins, les faibles quantités d'azote et de phosphore dans les milieux f/2 et PCR-S11-Red Sea, et les croissances cellulaires observées par les  $A_{750nm}$  associées aux mesures de consommations azotées (dosages des ions  $NO_3^-$  ou  $NH_4^+$ ) indiquent sans ambiguïté qu'une carence nutritive en azote a bien été occasionnée. L'absence de production de glucides extracellulaires par ces souches ne peut donc pas être imputée à une absence de stress azoté.

Outre la carence en nutriments, l'intensité lumineuse, l'accessibilité à la lumière (cycle jour/nuit) et le spectre de longueurs d'ondes utilisé pour éclairer les cultures peuvent également être à l'origine de la synthèse ou de l'absence de synthèse ou de l'amélioration de synthèse d'EPS par les microalgues et les Cyanobactéries (**Ge et al., 2014a, 2014b ; You & Barnett, 2004**). Ainsi, **Merchuk et al. (1998)** ont observé une meilleure productivité en EPS chez *Porphyridium* sp. lorsque les cellules sont exposées 90 % du temps à la lumière avec une irradiance de  $150 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , et 95 % du temps à la lumière pour une irradiance plus forte de  $300 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Par ailleurs, *Arthrospira platensis* multiplie par 2 sa production d'EPS lorsqu'elle est cultivée sous 180 au lieu de  $50 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (**Trabelsi et al., 2009**). De même, la production d'EPS par *Rhodella violacea* est maximale lorsque les cellules sont cultivées sous une irradiance de saturation (**Villay et al., 2013**). Enfin, les spectres lumineux rouges (600-700 nm) et bleus (400-500 nm) permettent d'améliorer la production d'EPS chez *Porphyridium cruentum* par rapport à un mélange de lumière bleue/blanche (**You & Barnett, 2004**). Certaines souches, identifiées comme étant de phénotype [EPS-] lors de cette étude, ont été capables de se développer aux deux irradiances ( $150$  et  $300 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), suggérant que la lumière ne serait pas en cause dans la non production d'EPS. De plus, il semble qu'une forte irradiance ( $300 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) n'était pas suffisante pour induire la production d'EPS. D'autres paramètres liés aux conditions de culture pourraient être incriminés dans l'absence de production d'EPS comme la température ou la salinité. A titre d'exemple, la température impacte la production d'EPS par la

microalgue *Botryococcus braunii*. Celle-ci est maximale lorsque les cellules sont cultivées à 28 °C, et réduite à des températures comprises entre 20-23 °C et à 32 °C, et cela pour une productivité en biomasse similaire (Lupi *et al.*, 1991). De même, *Anabaena* sp. multiplie d'un facteur 5 sa production en EPS lorsque la température de culture passe de 30-35 °C à 40-45 °C (Moreno *et al.*, 1998). La concentration saline peut aussi impacter la production d'EPS par les microorganismes photosynthétiques. En effet, la production d'EPS chez *Dunaliella salina* est 17 fois plus importante qu'elle est cultivée avec une concentration en NaCl de 5 M plutôt que 0,5 M (944 mg.L<sup>-1</sup> et 56 mg.L<sup>-1</sup>, respectivement) (Mishra & Jha, 2009). Un phénomène similaire a été observé chez *Microcoleus vaginatus* (Chen *et al.*, 2006 ; Hu *et al.*, 2003), *Scytonema javanicum*, *Phormidium tenue*, *Nostoc* sp. et *Desmococcus olivaceus* (Hu *et al.*, 2003), *Spirulina* sp. (Nicolaus *et al.*, 1999) et *Synechocystis* (Ozturk & Aslim, 2010). Des phénomènes inverses ont été observés chez *Aphanocapsa halophyta* (Sudo *et al.*, 1995), *Anabaena* sp. (Moreno *et al.*, 1998) et *Cyanothece* sp. (De Philippis *et al.*, 1993). Enfin, la dernière explication possible serait que les souches de phénotype [EPS-] produisent des PS liés aux cellules (BPS). Dans ce cas précis elles ne pouvaient pas être détectées par la méthode d'extraction employée (centrifugation) qui éliminait volontairement la biomasse (l'objectif du projet était de se focaliser sur les EPS) et les faisaient donc apparaître comme non productrices d'EPS.

Le groupe phénotype [EPS+] est composé des souches pour lesquelles une croissance cellulaire a été mesurée et dont le dosage des glucides extracellulaires totaux donnait un résultat supérieur à la valeur seuil de 0,05 g.L<sup>-1</sup> pour au moins une des deux intensités lumineuses utilisées. Il comprend 44 microalgues et 1 Cyanobactérie, le tout réparti dans 7 phyla, 13 classes, 15 ordres, 18 familles et 24 genres. Ce résultat est surprenant en raison du très grand nombre de Cyanobactéries déjà décrites pour la production d'EPS (De Philippis *et al.*, 2001 ; Rossi & De Philippis, 2016 ; Tableau 3). Néanmoins, il peut s'expliquer par le faible nombre de Cyanobactéries criblées (seulement 16) par rapport aux microalgues. De plus les Cyanobactéries sont connues pour produire des BPS, les faisant apparaître négatives dans les conditions de criblage testées. Bien que certaines familles de microalgues telles que les Synechococcaceae (Cyanobactéries), Isochrysidaceae et Pavlovaceae (Haptophyta) ainsi que les Chlorodendraceae (Chlorophyta) soient présentes dans chacun des 3 grands groupes de phénotypes ([AbsC], [EPS-] et [EPS+]), on constate que la grande majorité des souches de phénotype [EPS+] appartiennent à des genres qui n'apparaissent pas dans les groupes de phénotypes [AbsC] et [EPS-]. Les microalgues constitutives du groupe de phénotype [EPS+]

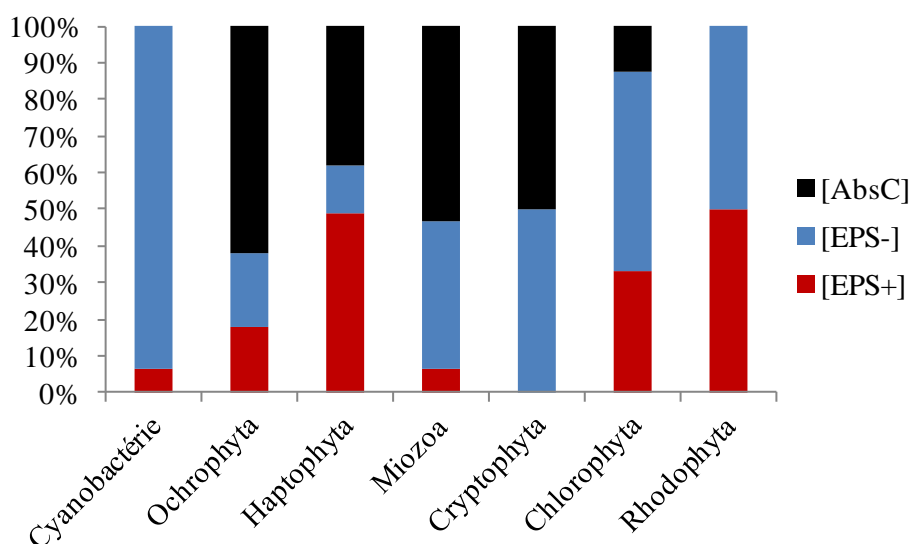


appartiennent essentiellement au règne des Chromista (30 espèces). Dix espèces appartiennent au règne des Plantae et 4 n'ont pas pu être classées *via* leur phylogénie en raison de l'absence d'information disponible dans la RCC. *Synechococcus* (RCC2380) est l'unique membre procaryote de ce groupe. Ce genre est déjà connu pour la production d'EPS (**Philips et al., 1989**). Les Chromista de phénotype [EPS+] appartiennent principalement aux phyla des Haptophyta (22 souches) et Ochrophyta (6 souches). Les Haptophyta phénotype [EPS+] sont équitablement représentés par les classes des Coccolithophyceae (11 souches) et Pavlovophyceae (10). Chez les Coccolithophyceae, la famille des Isochrysidaceae constitue près de 45 % des souches phénotypes [EPS+]. Quant aux Pavlovophyceae, ils sont représentés par l'unique famille des Pavlovaceae. Parmi les Ochrophyta de phénotype [EPS+], 4 des 5 souches appartiennent à la famille des Pinguiochrysidaceae. Il s'agit des genres *Phaeomonas* (RCC4470) et *Glossomastix* (RCC3685, RCC3688 et RCC3707). Les souches de phénotype [EPS+] du royaume des plantes appartiennent aux phyla des Chlorophyta et Rhodophyta. Chez les Chlorophyta, la famille des Chlorodendrophyceae est la plus représentée avec 4 souches (RCC128, RCC133, RCC1564 et RCC4435). Toutes ces souches appartiennent au genre *Tetraselmis*. En ce qui concerne les Rhodophyta, 2 souches de phénotypes [EPS+] (RCC655 et RCC4628) appartenant respectivement aux genres *Rhodella* et *Porphyridium* ont été détectées comme productrices d'EPS. Ce résultat n'est pas surprenant car ces genres ont déjà fait l'objet de nombreuses études pour leur faculté à produire des EPS (**Roussel et al., 2015 ; Villay et al., 2013 ; Soanen et al., 2016 ; Percival & Foyle, 1979 ; Capek et al., 2008 ; Cohen & Arad, 1998**).

Globalement, lorsque l'on considère les genres auxquels appartiennent les souches de phénotype [EPS+], on constate qu'au moins la moitié des espèces ayant été capables de se développer dans les conditions du criblage et appartenant à ce même genre sont présentes dans ce groupe. Cela concerne les genres *Bigelowiella*, *Calyptrosphaera*, *Ochrosphaera*, *Chrysotila* (2 souches sur 3), *Isochrysis*, *Emiliana* (1 souche sur 2), *Prymnesium*, *Exanthemachrysis*, *Pavlova*, *Rebecca*, *Amphidinium*, *Pelagococcus*, *Glossomastix* (3 souches sur 4), *Phaeomonas*, *Tetraselmis* (4 souches sur 6), *Dunaliella* (1 souche sur 2), *Prasinococcus*, *Chlorella* (1 souche sur 2), *Coccomyxa*, *Porphyridium* et *Rhodella* (**Tableau 13**). A contrario seulement 1 souche de *Synechococcus* sur les 7 testées est présente dans le groupe phénotype [EPS+], et seulement 1 souche sur 3 pour le genre *Diacronema*. Deux explications sont possibles pour expliquer ces résultats. La première serait que les souches apparaissant comme phénotype [EPS-] (*Diacronema lutheri* et *Diacronema viridis*) soient des

espèces différentes de celle du groupe phénotype [EPS+] (*Diacronema* sp. (RCC3514)), et qu'elles ne soient pas capables de produire des EPS ou bien qu'elles produisent des BPS. La seconde explication serait que ces espèces ne soient pas capables de produire des EPS dans les conditions de criblage testées.

Pour conclure, Les 166 souches de microalgues et Cyanobactéries criblées ont pu être classées en 3 groupes : 60 souches de phénotype [AbsC], 61 souches de phénotype [EPS-] et 45 souches de phénotype [EPS+]. Le criblage a été réalisé sur un large panel taxonomique puisque les microalgues sont réparties dans 6 phyla. La **Figure 39** présente la proportion des souches de phénotype [AbsC], [EPS-] et [EPS+] au sein de chaque phyla.



**Figure 39** : Proportion des souches de phénotype [AbsC], [EPS-] et [EPS+] au sein des différents phyla.

Le **Tableau 3** (partie I.3.4.2.3) présente une liste exhaustive des souches identifiées dans la littérature en tant que producteurs d'EPS. On remarque, après comparaison des genres des souches de phénotype [EPS+] de ce travail avec celles présentes dans ce tableau, que la plupart d'entre elles appartiennent à des genres inconnus dans la littérature pour la production d'EPS solubles (20/25 genres des souches [EPS+]). Cependant, il était impossible à ce stade de l'étude de corroborer les résultats positifs issus des dosages colorimétriques sur les surnageants de culture avec la production d'EPS. Des analyses supplémentaires se sont donc révélées nécessaires pour confirmer la nature des glucides extracellulaires détectés comme étant des EPS.

## 1.2 Compositions en monosaccharides par CEAHP-DAP et CPG/SM-IE

Vingt souches de phénotype [EPS+] (45 % du total des souches [EPS+]) ont été mises en culture pendant 60 jours dans un milieu supplémenté en azote et phosphate (partie II.2.2). En effet, l'utilisation d'un milieu enrichi en N et P augmente de manière significative la production de biomasse algale et la production d'EPS (Soanen *et al.*, 2016 ; Villay *et al.*, 2013 ; Gaignard *et al.*, 2018). Les 20 souches de phénotype [EPS+] représentaient 5 des 7 phyla, 7 des 15 ordres, 10 des 18 familles et 11 des 25 genres du groupe phénotype [EPS+]. Les EPS ont été extraits et purifiés (partie II.6.1) avant d'être hydrolysés puis analysés en CEAHP-DAP et CPG/SM-IE. Certaines analyses ont été effectuées sur des EPS provenant de souches de la même famille, et parfois du même genre mais d'espèces différentes dans le but d'étudier la variabilité des compositions. Les compositions en monosaccharides des EPS analysés par les deux méthodes sont présentées dans le **Tableau 14**.

Malgré les quelques différences dans les ratios molaires observées entre les deux méthodes analytiques, les résultats des compositions sont assez similaires, avec les mêmes monosaccharides majoritaires (Pearson:  $R^2 = 0.963$  ;  $p < 0,001$ ). Parmi les 11 genres dont la composition a été analysée, 3 d'entre eux ont déjà été identifiés comme producteur d'EPS dans la littérature. Il s'agit de *Synechococcus* (RCC2380), *Dunaliella* (RCC5) et *Porphyridium* (RCC4628) (Roussel *et al.*, 2015 ; Philips *et al.*, 1989 ; Mishra & Jha, 2009 ; Raposo *et al.*, 2014). Ainsi, l'EPS de *Dunaliella* (RCC5) est essentiellement composé de Gal, Rha, Xyl, et GalA (28, 21, 17 et 11 %, respectivement) avec des traces d'autres monosaccharides (Glc, Ara et GlcA). Cette composition présente quelques similarités avec celle de l'EPS de *Dunaliella salina* composé majoritairement de Xyl, Gal et Glc comme décrit par Mishra & Jha (2009). L'EPS de *Porphyridium* (RCC4628) possède une composition très similaire aux autres EPS produits par le genre *Porphyridium* incluant les espèces *cruentum*, *aerugineum* et *marinum* (Geresh *et al.*, 2009 ; Percival & Foyle, 1979 ; Soanen *et al.*, 2016 ; Roussel *et al.*, 2015). Il s'agit d'un xylane majoritairement composé de Xyl, Gal et Glc (49, 27 et 20 %, respectivement). L'EPS isolé de *Synechococcus* (RCC2380) est un hétéroglucane composé majoritairement de Glc, Gal et Fuc (48, 30 et 22 %, respectivement) avec des traces d'autres monosaccharides. Les propriétés physico-chimiques en solution d'un EPS extrait de *Synechococcus* avaient déjà été étudiées par Philips *et al.* (1989), mais aucune composition en monosaccharides n'avait été déterminée. Il s'agit donc de la première composition attribuée à un EPS du genre *Synechococcus*.

Les 17 autres compositions d'EPS proviennent de 8 genres non identifiés pour la production de ce type de biopolymère : *Chrysotila* (CCAP904/1, RCC4633), *Diacronema* (RCC3514), *Exanthemachrysis* (RCC1544), *Glossomastix* (RCC3685, RCC3688, RCC3707), *Isochrysis* (RCC3686), *Pavlova* (RCC1545, RCC3438, RCC4120, RCC4037), *Prasinococcus* (RCC2684) et *Tetraselmis* (RCC133, RCC1564, RCC4435). Les résultats de l'analyse de leurs compositions monosaccharidiques synthétisés dans le **Tableau 14** montrent que tous les oses neutres (Fuc, Ara, Rha, Gal, Glc, Gal, Xyl et Man), que l'on retrouve habituellement dans les compositions d'EPS de microalgues et Cyanobactéries, ont été détectés dans au moins un EPS. Tous les EPS analysés sont des hétéropolysaccharides et les compositions sont extrêmement diverses. Ils sont principalement composés de 2 à 5 monosaccharides, incluant des oses neutres et des acides uroniques. On trouve ainsi des polymères riches en Gal et Ara (3 EPS), Gal et Xyl (2 EPS), Glc et Gal (2 EPS), Rha et Gal (2 EPS), Man et Gal (1 EPS), Fuc et Rha (3 EPS), Ara et Rha (1 EPS). Quelques exceptions sont notables, avec des teneurs très élevées pour 1 ou 2 monosaccharides. A titre d'exemple, les EPS isolés de *Tetraselmis rubens* (RCC133) et *Prasinococcus* (RCC2684) sont majoritairement composés de Gal (89 et 74 %, respectivement), et l'EPS isolé de *Tetraselmis globosa* (RCC1564) est constitué à 60 % de Rha. De plus, l'EPS de *Pavlova* (RCC4120) est composé majoritairement de Gal et Glc (40 et 35 %, respectivement).

**Tableau 14** : Compositions en monosaccharides obtenues par CPG/SM-IE et CEAHP-DAP des EPS des souches phénotype [EPS+].

Genres	Espèces	Numéro RCC	Rha		Gal		Ara		Glc		Man		Fuc		Xyl		Rib		GlcA		GalA	
			(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
<i>Chrysolita</i>	<i>dentata</i>	CCAP904/1	-	-	33	36	36	33	tr	tr	10	8	-	tr	17	16	-	-	4	4	-	tr
	sp.	4633	tr	tr	31	33	13	11	42	45	-	-	-	-	10	8	-	-	4	2	-	tr
<i>Isochrysis</i>	<i>braarudii</i>	3686	9	4	27	23	39	47	3	3	-	-	-	-	18	19	+	+	4	2	-	-
		6688	15	19	36	46	4	tr	-	-	34	32	-	-	-	-	-	-	11	tr	-	tr
<i>Diacronema</i>	sp.	3514	33	37	26	23	17	8	15	16	-	-	-	-	5	10	-	-	4	4	-	tr
<i>Exanthemachrysis</i>	sp.	1544	2	3	16	14	8	14	8	7	15	13	-	-	14	12	-	-	37	32	-	5
<i>Pavlova</i>	<i>gyrans</i>	1545	3	4	32	21	13	18	14	7	-	-	tr	6	21	25	-	-	9	11	8	7
	sp.	4037	46	36	10	11	26	23	6	10	-	-	-	2	12	14	-	-	-	2	-	2
	sp.	4120	7	7	34	40	13	4	23	35	4	-	-	7	19	2	-	-	tr	3	-	2
	sp.	3438	47	30	27	29	5	14	11	17	tr	-	-	-	3	6	-	-	5	4	-	-
<i>Glossomastix</i>	sp.	3688	28	20	4	2	-	-	-	-	-	-	54	57	-	-	-	-	9	10	5	11
	sp.	3685	20	19	-	-	-	-	-	-	-	-	56	57	-	-	-	-	10	8	14	13
	sp.	3707	31	27	2	3	-	-	-	tr	-	-	40	47	-	tr	-	-	6	7	21	15
<i>Synechococcus</i>	sp.	2380	-	tr	38	27	-	tr	38	49	-	-	24	20	-	-	-	-	-	tr	-	tr
<i>Tetraselmis</i>	<i>globosa</i>	1564	63	61	19	20	tr	tr	5	5	-	-	-	-	5	4	-	-	-	2	5	-
	<i>rubens</i>	133	nd	6	nd	89	nd	-	nd	tr	nd	-	nd	2	nd	tr	nd	-	nd	-	nd	2
	sp.	4435	5	3	33	35	24	19	5	7	8	7	-	9	23	14	-	-	2	4	-	2
<i>Dunaliella</i>	sp.	5	18	21	19	28	4	5	2	tr	11	13	-	-	13	17	-	-	19	4	14	11
<i>Prasinococcus</i>	sp.	2684	7	4	67	74	7	3	9	7	-	-	-	2	7	9	-	-	3	tr	-	-
<i>Porphyridium</i>	sp.	4628	-	-	29	27	2	2	22	20	-	-	-	-	44	49	-	-	3	2	-	-

(1) : analyse en CPG/SM-IE, (2) : analyse en CEAHP-DAP, + : présence, - : absence, tr : trace, nd : non déterminé.   : Rha/Ara majoritaires,   : Rha/Gal majoritaires,   : Fuc/Rha majoritaires,   : Glc/Gal majoritaires,   : Gal/Xyl majoritaires,   : Ara/Gal majoritaires,   : Gal/Man majoritaires,   : GlcA majoritaire,   : présence prédominante d'un monosaccharide.

La plupart des EPS analysés contiennent du GlcA et/ou du GalA. Ils sont présents en quantités variables, parfois uniquement sous la forme de traces (RCC6688), en quantités faibles (< 8 %) (RCC4435, RCC4120, RCC4037), ou en quantités très importantes (> 30 % chez *Exanthemachrysis* (RCC1544) et dans une plus faible proportion chez *Pavlova gyrans* (RCC1545), *Dunaliella salina* (RCC5) et les souches du genre *Glossomastix* (RCC3688 et RCC3707)). De plus, le GlcA est retrouvé dans 16 compositions d'EPS sur les 20 totales (à l'exception des souches *Synechococcus* (RCC2380), *Tetraselmis rubens* et *Tetraselmis globosa* (RCC133 et RCC1564) et *Pavlova* (RCC4037)). L'EPS d'*Exanthemachrysis* (RCC1544) se distingue fortement des autres polymères par le monosaccharide majoritaire de sa composition (35-37 % de GlcA). Cette teneur très élevée est remarquable, mais pas inédite pour un EPS de microalgue. En effet, le GlcA a déjà été retrouvé comme monosaccharide majoritaire dans les EPS de *Closterium* sp., *Amphora* sp., *Hyalotheca dissiliens* et *Anabaena spiroides* (Paulsen & Vieira, 1994 ; Domozych *et al.*, 1993 ; Gouvêa *et al.*, 2005 ; Jin *et al.*, 2018). Il est présent à des teneurs très élevées (35,8 et 55 %) uniquement chez *Closterium* sp. et *Amphora* sp., respectivement.

Pour conclure, tous les EPS sont i) des hétéropolymères, ii) composés d'au moins 2 monosaccharides, iii) et tous contiennent au moins 1 acide uronique (à l'exception de *Synechococcus* (RCC2380), qui est également la seule Cyanobactérie phénotype [EPS<sup>+</sup>]). A nouveau, cela montre que les EPS produits par les microalgues possèdent des compositions très complexes et très diversifiées. Dix-sept d'entre eux sont issus de genres qui jusqu'à présent n'avaient pas été identifiés comme producteurs d'EPS. Aucune donnée concernant les mises en culture des genres *Diacronema*, *Exanthemachrysis* et *Pavlova* n'a pu être trouvée dans la littérature. Jusqu'à aujourd'hui, les microalgues du royaume des Chromista productrices d'EPS appartenaient aux phyla des Miozoa (3 espèces concernées, Hasui *et al.*, 1995 ; Liu *et al.*, 2015 ; Yim *et al.*, 2003) et des Ochrophyta (classe des Bacillariophyceae, **Tableau 3**). Les résultats présentés dans cette partie ont permis d'identifier cinq nouveaux genres appartenant au phylum des Haptophyta comme producteurs d'EPS (*Chrysofila*, *Isochrysis*, *Diacronema*, *Exanthemachrysis* et *Pavlova*). Cela représente deux nouvelles classes (Coccolithophyceae et Pavlovophyceae), deux nouveaux ordres (Isochrysidales et Pavlovales) et deux nouvelles familles (Isochrysidaceae et Pavlovaceae). Les résultats ont aussi permis d'enrichir les données sur les phyla des Ochrophyta (Pinguiphyceae, *Glossomastix*) et Chlorophyta (Chlorodendrophyceae, *Tetraselmis* et Palmophyllophyceae, *Prasinococcus*).

## 2. Cultures en photobioréacteurs

### 2.1 Production de biomasse et d'exopolysaccharides

Dans une optique de production plus intensive et de caractérisation structurale plus fine d'EPS obtenus en conditions contrôlées se rapprochant de celles de la production industrielle (stérilité de la culture, contrôle du pH et de la température, supplémentation en CO<sub>2</sub>), 6 microalgues et 1 Cyanobactérie de phénotype [EPS+] ont été sélectionnées en fonction de leur composition en monosaccharides et mises en culture dans des PBR de 1,4 et 5 L. Cela concerne *Glossomastix* (RCC3688), *Glossomastix* (RCC3707), *Chrysolita dentata* (CCAP904/1), *Pavlova* (RCC3438), *Diacronema* (RCC3514), *Exanthemachrysis* (RCC1544) et *Synechococcus* (RCC2380). Ces cultures constituent une première approche de la montée en échelle permettant d'identifier d'éventuels problèmes liés au scale-up.

Trois essais de cultures en PBR 5 L ont été réalisés avec les souches *Glossomastix* (RCC3707) et *Synechococcus* (RCC2380). Néanmoins, aucun de ces essais ne s'est montré fructueux, ce qui a été attribué à une sensibilité de ces souches au cisaillement apporté par l'agitation mécanique. La souche *Glossomastix* (RCC3707) a alors été cultivée dans des bouteilles (5 L et 2 × 2 L) en conditions airlift avec le milieu f/2 enrichi, à 20 °C et sous un cycle jour/nuit de 16 h/8 h. La souche a été capable de se développer dans ces conditions. Cependant, le dénombrement cellulaire ainsi que la détermination de la concentration en glucides extracellulaires n'ont pu être réalisés en raison de l'absence d'homogénéité de la culture. En effet, la souche formait des « agrégats de cellules » similaires à des filaments et collait aux parois des bouteilles. De plus, la matrice polysaccharidique excrétée dans le milieu de culture provoquait une augmentation progressive de leur viscosité, réduisant ainsi l'agitation liée à l'aération de la culture et donc son homogénéité. Les 9 L de culture ont cependant été traités (centrifugation puis purification par filtration tangentielle du surnageant) et 5,9 g d'EPS purifiés ont été obtenus. Des tests de culture avec ce même système airlift ont été réalisés avec *Synechococcus* (RCC2380) mais sans succès. Il semblerait que cette souche soit particulièrement sensible au cisaillement, y compris celui entraîné par le bullage, ce qui expliquerait son incapacité à croître en condition airlift. *Synechococcus* étant la seule Cyanobactérie identifiée comme phénotype [EPS+], la production de son EPS en plus grande quantité semblait pertinente. Six cultures en erlenmeyers de 500 mL (contenant 225 mL de volume de culture final) ont alors été réalisées, avec le milieu « f/2 modifié », à 20 °C, sous

un cycle jour/nuit de 16 h/8 h et avec une agitation orbitale de 100 rpm. Après environ 2 mois, les cultures ont été traitées et 1,4 g d'EPS purifiés ont été obtenus.

Concernant les cultures en PBR en conditions photoautotrophes, la croissance dépend de la composition du milieu et surtout de l'irradiance. L'utilisation d'un milieu enrichi en N et P, ainsi que l'application d'une irradiance proche du point de saturation spécifique à chaque microalgue augmente de manière significative la production de biomasse (**Soanen *et al.*, 2016 ; Villay *et al.*, 2013 ; Gaignard *et al.*, 2018**). Ce point de saturation étant spécifique à chaque souche et inconnu pour celles mises en culture dans cette étude, l'irradiance incidente initiale de  $150 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  a été choisie car identique à celle utilisée durant le criblage. En revanche, les cultures ont été réalisées avec le milieu « f/2 enrichi » afin d'optimiser la production de biomasse (croissance cellulaire et production d'EPS) (partie II.4.1.1). La croissance cellulaire a été suivie par dénombrement en cellule de Malassez et de façon indirecte par suivi de la consommation des ions  $\text{NO}_3^-$  (parties II.5.1 et II.5.2). La production d'EPS a été évaluée après une étape de dessalage, par quantification des oses totaux dans le surnageant de culture (parties II.5.3 et II.7.4). Les **Figures 40 à 44** présentent les cinétiques de croissance des différentes souches cultivées en PBR. Le **Tableau 15** présente les concentrations initiales et finales du nombre de cellules. $\text{mL}^{-1}$ , des ions  $\text{NO}_3^-$  et des glucides extracellulaires ( $\text{g.L}^{-1}$ ) des cultures en PBR. Les 5 souches ont été capables de se développer, atteignant des concentrations finales en biomasse différentes.

Pour les souches *Glossomastix* et *Exanthemachrysis*, la croissance cellulaire est corrélée avec la consommation en ions  $\text{NO}_3^-$  (**Figures 40 et 44**). La croissance cellulaire de *Chrysolita dentata* augmente continuellement entre  $T_0$  et  $T_{60}$  alors que la concentration des ions nitrates dans le milieu est proche de  $0 \text{ g.L}^{-1}$  dès  $T_{33}$  (**Figures 41**). A l'inverse, on observe une diminution de la concentration en ions nitrates entre  $T_0$  et  $T_{30}$  chez *Pavlova* sans que celle-ci soit « réellement corrélée » avec une augmentation de la concentration cellulaire. En effet, cette dernière augmente significativement à partir du  $T_{30}$  et jusqu'au  $T_{50}$  (**Figures 42**). Il semble donc que la croissance cellulaire soit décalée dans le temps par rapport à la consommation en azote. Néanmoins, cela reste une hypothèse qui nécessite d'être vérifiée *via* la réalisation de nouvelles cultures en PBR avec les mêmes conditions. Enfin, un arrêt de la croissance est observé à  $T_{50}$ , probablement à cause de la carence en azote suivi par une légère baisse de la concentration cellulaire.



**Tableau 15** : Concentrations initiales ( $T_0$ ) et finales ( $T_f$ ) du nombre de cellules.mL<sup>-1</sup>, des ions NO<sub>3</sub><sup>-</sup> et glucides extracellulaires des souches cultivées en PBR 5 L et 1,4 L, ainsi que les quantités d'EPS obtenues après extraction et purification.

Cultures	Souches	Concentrations à $T_0$			Concentrations à $T_f$			Quantité d'EPS obtenue après extraction et purification (g)
		Nombre de cellules.mL <sup>-1</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (g.L <sup>-1</sup> )	Glucides extracellulaires (g.L <sup>-1</sup> )	Nombre de cellules.mL <sup>-1</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (g.L <sup>-1</sup> )	Glucides extracellulaires (g.L <sup>-1</sup> )	
PBR 5 L	<i>Glossomastix</i> sp. (RCC3688)	$2,5 \times 10^5$	1,21	0,01	$9,7 \times 10^7$	0,04	1,02	7,5
	<i>Exanthemachrysis</i> sp. (RCC1544)	$3,1 \times 10^7$	0,91	0	$5,2 \times 10^7$	0,03	0,72	3,18
PBR 1,4 L	<i>Chrysotila dentata</i> (CCAP904/1)	$2,1 \times 10^6$	1,59	0	$14,8 \times 10^6$	0,03	0,81	1,33
	<i>Pavlova</i> sp. (RCC3438)	$5,8 \times 10^5$	0,68	0,01	$5,5 \times 10^6$	0,02	0,56	1,58
	<i>Diacronema</i> sp. (RCC3514)	$5,5 \times 10^5$	0,83	0,01	$5,8 \times 10^5$	0,16	0,39	1,54
Airlift (2 × 2 L et 5 L)	<i>Glossomastix</i> sp. (RCC3707)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	5,92
Erlenmeyer 6 × 500 mL	<i>Synechococcus</i> sp. (RCC2380)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,4

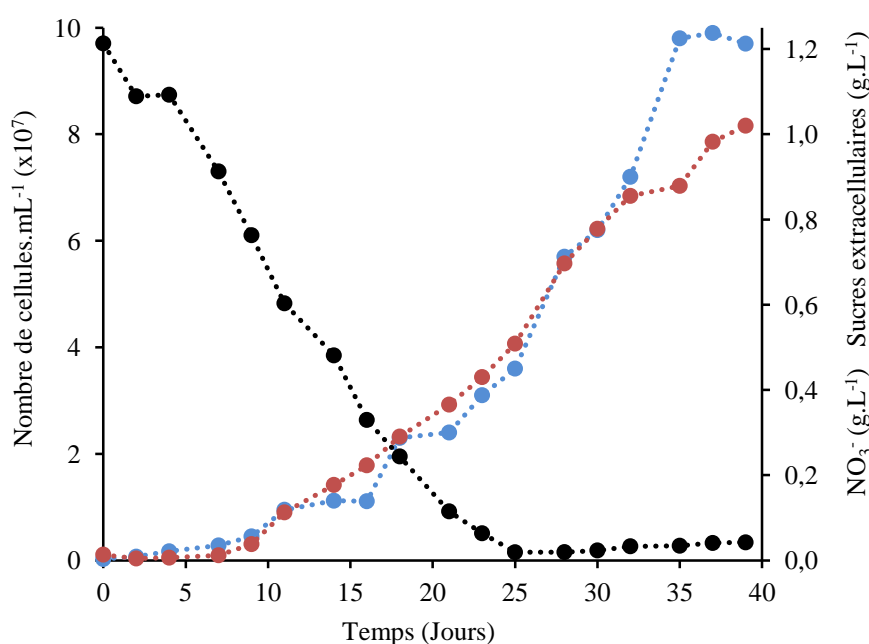
nd : non déterminé

Pour *Diacronema*, la croissance cellulaire augmente entre le  $T_0$  et le  $T_{14}$  puis chute drastiquement jusqu'à  $T_{35}$ . En parallèle, la consommation des ions  $\text{NO}_3^-$  est continue entre  $T_0$  et  $T_{18}$ , puis semble s'arrêter à partir de  $T_{23}$  (**Figures 43**). Cette diminution brutale de la concentration cellulaire ne serait donc pas due à une carence en  $\text{NO}_3^-$  puisque ces derniers sont encore présents à  $0,4 \text{ g.L}^{-1}$  dans le milieu de culture au moment du déclin de la concentration cellulaire à  $T_{14}$  et à  $0,16 \text{ g.L}^{-1}$  à  $T_f$ . La cause de cette décroissance cellulaire n'a pas été identifiée dans le cadre de cette étude et seules des hypothèses peuvent être émises, comme par exemple une agitation mécanique (cisaillement) trop importante ou une intensité lumineuse trop élevée et non adaptée aux capacités photosynthétiques de la souche. Cela pourrait induire une photoinhibition et donc l'arrêt de la croissance cellulaire.

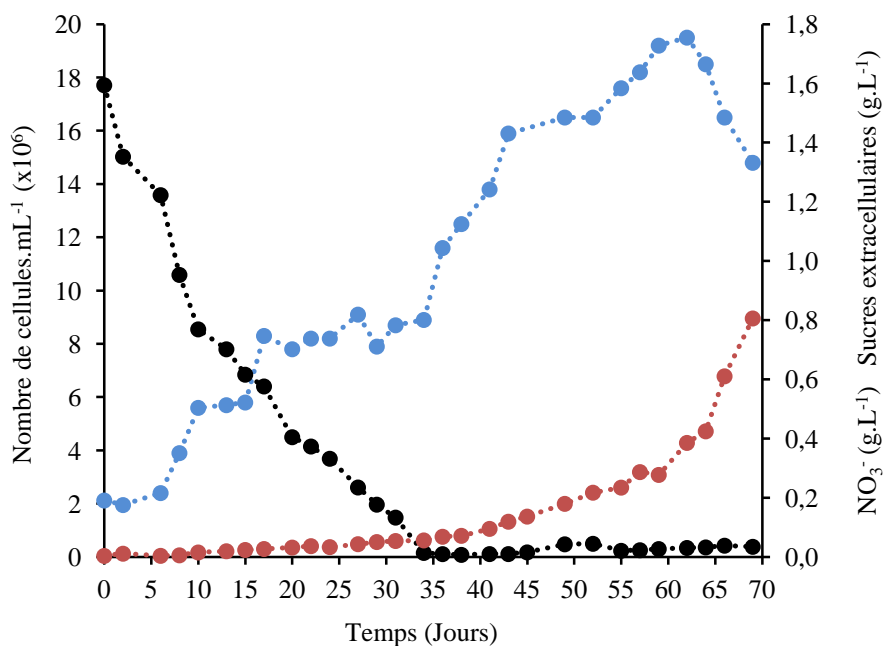
La production de glucides extracellulaires est observée pour toutes les souches. Les quantités de matières obtenues après l'étape de purification sont indiquées dans le **Tableau 15**. Dans certains cas, la production d'EPS chez les microalgues et les Cyanobactéries intervient lors de l'entrée en phase stationnaire de croissance. Cette augmentation significative intervient suite à une condition de stress nutritif, tel que la carence azotée par exemple (**Ramus, 1972 ; Soanen et al., 2016 ; Moreno et al., 1998 ; Reddy et al., 1996 ; Villay et al., 2013 ; Gagnard et al., 2018 ; Flaibani et al., 1989 ; Fattom & Shilo, 1984, 1985**). La production d'EPS peut également être améliorée lorsque la culture est réalisée dans un milieu avec une faible concentration en azote, comme cela a été démontré chez *Cyanothece* sp. par exemple (**De Philippis et al., 1993, 1998**). Des profils similaires de production d'EPS sont retrouvés pour les souches *Chrysothila dentata* et *Pavlova* (**Figures 41 et 42**). Les concentrations en glucides extracellulaires finales sont égales à  $0,81$  et  $0,56 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivement. En revanche, les profils de production de *Glossomastix* et *Exanthemachrysis* sont complètement différents. La production d'EPS démarre dès le  $T_8$  pour les 2 souches, soit bien en amont de la carence azotée. De plus, la production de glucides extracellulaires est continue tout au long de l'expérience (**Figures 40 et 44**). Les concentrations finales en glucides extracellulaires sont égales à  $1,02 \text{ g.L}^{-1}$  et  $0,72 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivement. Des profils similaires ont été observés chez d'autres souches, principalement des Cyanobactéries telles que *Aphanocapsa halophytica* (**Sudo et al., 1995**), *Cyanospira capsulata* (**Vincenzini et al., 1990**), *Nostoc insulare* (**Volk et al., 2006**), *Chroococcus minutus* (**Fischer et al., 1997**), *Anacystis nidulans* (**Sangar & Dugan, 1972**), *Synechocystis* (**Panoff et al., 1988**), *Anabaena flos-aquae* (**Moore & Tischer, 1964**), *Anabaena cylindrical* (**Lama et al., 1996**) et

*Synechococcus* sp. (Phlips *et al.*, 1989), et chez les microalgues *Botryococcus braunii* (Lupi *et al.*, 1994 ; Fernandes *et al.*, 1989) et *Heterosigma akashiwo* (Lopes *et al.*, 2012).

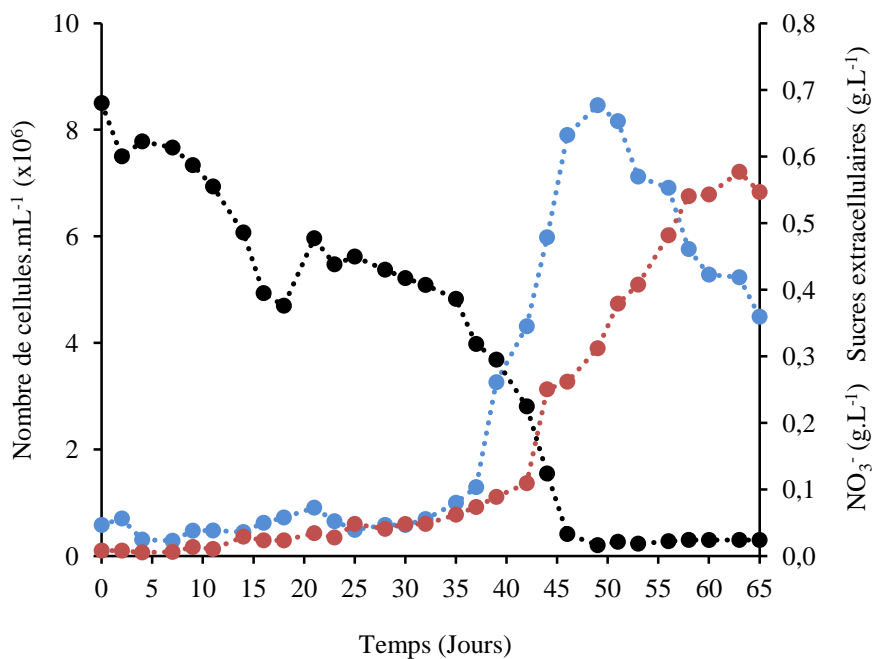
Compte tenu de sa courbe de croissance, le profil de production d'EPS par *Diacronema* reste ambigu. En effet, la production de glucides extracellulaires démarre dès T<sub>7</sub> et augmente jusqu'à atteindre un plateau à T<sub>23</sub>, correspondant à une concentration finale égale à 0,39 g.L<sup>-1</sup>. Cette production se produit sans que la carence en azote ait lieu puisque la concentration en NO<sub>3</sub><sup>-</sup> dans le milieu à T<sub>40</sub> est égale à 0,16 g.L<sup>-1</sup> (Figures 43). Comme décrit précédemment, la concentration cellulaire diminue rapidement à partir de T<sub>14</sub>. L'augmentation de la concentration en glucides dans le surnageant étant intervenue bien avant cette décroissance cellulaire (et n'ayant que peu variée après), il est peu probable qu'il s'agisse de glucides intracellulaires libérés lors de la mort cellulaire. La diminution de la concentration cellulaire pourrait donc avoir été occasionnée par un stress différent de la carence en azote, sans qu'il n'ait pu être identifié dans le cadre de cette étude. Cet état de stress des cellules pourrait avoir déclenché la production de glucides extracellulaires.



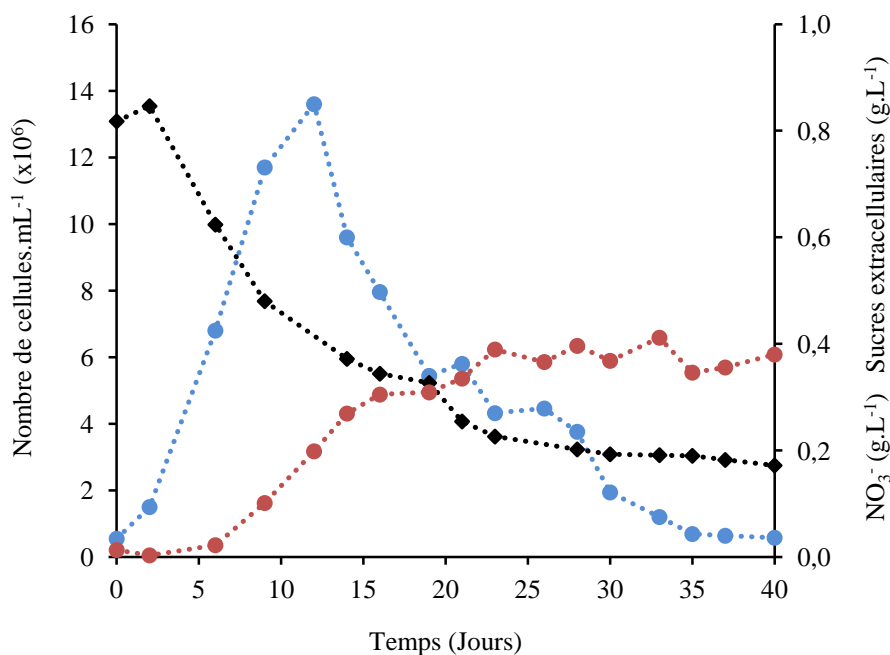
**Figure 40** : Croissance cellulaire (●), concentration en NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (●) et concentration en glucides extracellulaires (●) mesurées lors de la culture de *Glossomastix* sp. (RCC3688) en PBR 5 L.



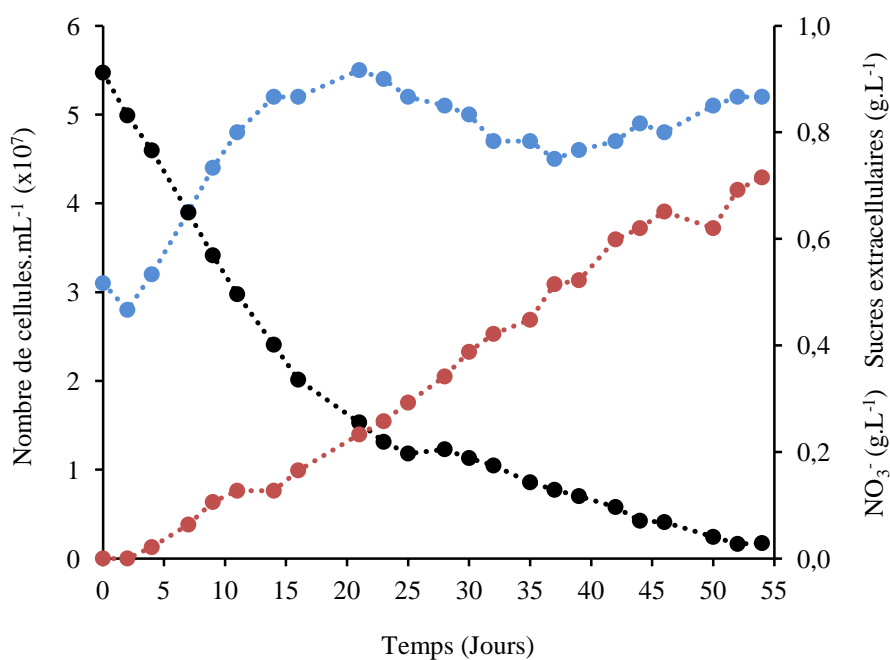
**Figure 41** : Croissance cellulaire (●), concentration en NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (●) et concentration en glucides extracellulaires (●) mesurées lors de la culture de *Chrysotila dentata* (CCAP904/1) en PBR 1,4 L.



**Figure 42** : Croissance cellulaire (●), concentration en NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (●) et concentration en glucides extracellulaires (●) mesurées lors de la culture de *Pavlova* (RCC3438) en PBR 1,4 L.



**Figure 43** : Croissance cellulaire (●), concentration en  $\text{NO}_3^-$  (●) et concentration en glucides extracellulaires (●) mesurées lors de la culture de *Diacronema* (RCC3514) en PBR 1,4 L.



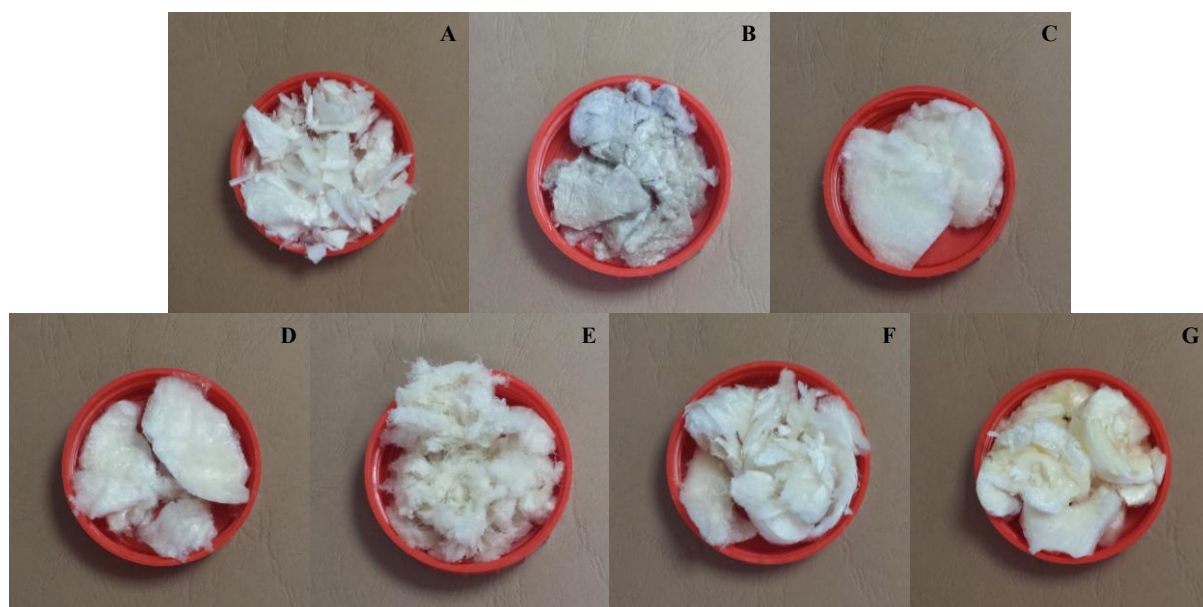
**Figure 44** : Croissance cellulaire (●), concentration en  $\text{NO}_3^-$  (●) et concentration en glucides extracellulaires (●) mesurées lors de la culture d'*Exanthemachrysis* (RCC1544) en PBR 5 L.

### 3. Caractérisation structurale des EPS

#### 3.1 Caractérisations biochimiques

La composition globale d'un polymère peut être déterminée par des dosages colorimétriques et turbidimétrie (partie II.5). Ceux-ci ont été effectués sur tous les polymères extraits des différentes cultures (PBR, bouteille airlift et erlenmeyer) présentés précédemment.

A partir de maintenant, les abréviations PSGN1, PSGN2, PSEN, PSCN, PSPN, PSDN et PSSN seront employées pour désigner les EPS issus des souches *Glossomastix* (RCC3688), *Glossomastix* (RCC3707), *Exanthemachrysis*, *Chrysofila dentata*, *Pavlova*, *Diacronema* et *Synechococcus*, respectivement. Tous les EPS après purification ont un aspect cotonneux (**Figure 45**). Le PSCN possède une couleur argentée tandis que les autres sont blancs.



**Figure 45** : Aspects des (A) PSGN1, (B) PSCN, (C) PSPN, (D) PSDN, (E) PSEN, (F) PSGN2 et (G) PSSN après purification.

A l'exception de PSCN, les solubilisations dans l'eau ont nécessité une étape d'agitation à 4 °C pendant 24 h afin d'obtenir des solutions homogènes. Ces solutions présentaient un caractère visqueux et la solubilisation des EPS au-delà de 20 g.L<sup>-1</sup> était très difficile. Les dosages ont été effectués sur des solutions à 10 g.L<sup>-1</sup> (à l'exception du dosage des sulfates). Les compositions globales des EPS de chaque souche sont résumées dans le **Tableau 16**.

**Tableau 16** : Compositions globales des EPS obtenus après cultures en PBR, Airlift ou Erlenmeyers. Les résultats sont exprimés en % massique d'échantillon. La conductivité (exprimée en  $\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) et a été déterminée sur des solutions d'EPS de  $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

EPS	Pureté*	Oses totaux	Oses neutres	Oses acides	Sulfates	Protéines	Conductivité	Eq. NaCl (%)
PSGN1 <i>Glossomastix</i> (RCC3688)	86	69,9	64,3	15	8,9	7,7	41,9	2,16
PSCN <i>Chrysotila dentata</i> (CCAP904/1)	85	53,9	48,7	13,5	9,7	25,2	33,8	1,75
PSPN <i>Pavlova</i> (RCC3438)	24	48,9	45,1	9,3	10,6	4,3	68,1	3,56
PSDN <i>Diacronema</i> (RCC3514)	26	47,3	44,3	7,9	10,6	3,3	57,2	2,98
PSEN <i>Exanthemachrysis</i> (RCC1544)	53	38,4	25,6	27,1	5,7	8,7	41,6	2,16
PSGN2 <i>Glossomastix</i> (RCC3707)	61	48,4	30,1	26,7	13,7	4,4	36	1,89
PSSN <i>Synechococcus</i> (RCC2380)	26	48,7	44,5	11,5	18,7	17,7	51,5	2,68

\*déterminée par CPG/SM-IE

Les EPS contiennent des teneurs en oses totaux comprises entre 38,4 et 69,9 % et la plupart sont constitués d'oses neutres (de 30,1 à 64,3 %). PSEN présente un taux d'acides uroniques supérieur à celui des oses neutres (27,1 contre 25,6 %, respectivement). Les teneurs en oses neutres et acides uroniques de PSGN2 sont proches (30,1 et 26,7 %, respectivement). Ces résultats sont cohérents avec les compositions en monosaccharides précédemment déterminées puisque PSEN, PSGN1 et PSGN2 sont relativement riches en GlcA et GalA (**Tableau 14**). Seule la teneur en oses acides de PSSN semble en contradiction avec la composition en monosaccharides déterminée précédemment puisqu'aucun acide uronique n'avait été identifié (**Tableau 14**). Ce résultat discordant pourrait être lié à un biais dans le dosage colorimétrique, telle qu'une interférence conduisant à un résultat erroné. Les analyses ultérieures de la composition en monosaccharides du polymère par CEAHP-DAP et CPG/SM-IE ont permis de vérifier cette hypothèse (partie III.3.3).

Les puretés des échantillons définies par les teneurs en oses totaux et par CPG/SM-IE sont variables. Les puretés de PSGN1 et PSCN sont très bonnes (85 et 86 %, respectivement), celles de PSGN2 et PSEN sont acceptables (61 et 53 %, respectivement), tandis que celles de PSSN, PSPN et PSDN sont très faibles (26, 24 et 26 %, respectivement). Chez ces derniers, la pureté déterminée en CPG/SM-IE est inférieure à la valeur obtenue par le dosage des oses totaux, ce qui est l'inverse pour tous les autres produits.

La pureté d'un polymère va varier en fonction des conditions d'extraction et de purification (**Delattre et al., 2016**). Dans cette étude, tous les EPS ont été extraits et purifiés de la même manière. De plus, les mesures de conductivité déterminées à l'aide d'un conductimètre (Hach, sensIONTM+ EC7) sur des solutions d'EPS à 1 g.L<sup>-1</sup> ont révélé que les sels du milieu de culture avaient été correctement éliminés lors de l'ultrafiltration tangentielle. Ces résultats n'expliquent donc pas les différences de puretés observées. Cependant, on remarque que les taux de pureté faibles proviennent des EPS issus des cultures pour lesquelles un déclin de la croissance cellulaire a été observé (**Figures 41 et 42**). On peut donc émettre l'hypothèse que la diminution de la croissance cellulaire observée, provenant peut être d'une lyse cellulaire, aurait entraîné par la même occasion la libération de métabolites intracellulaires dans le milieu de culture. Ainsi, des composés solubles co-extraits avec l'EPS lors de la centrifugation n'auraient ensuite pas été éliminés par l'ultrafiltration tangentielle, entraînant ainsi une diminution de la pureté de l'échantillon.

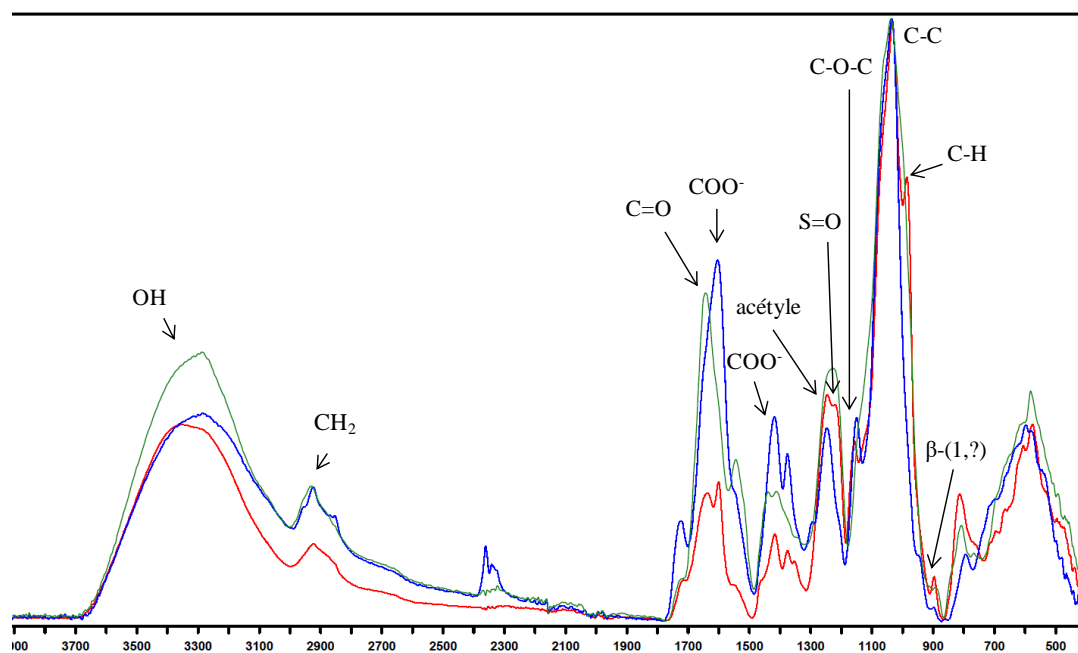


Tous les EPS extraits sont sulfatés. Les taux sont compris entre 5,7 (PSEN, *Exanthemachrysis*) et 18,7 % (PSSN, *Synechococcus*) (**Tableau 16**). Ces résultats sont en accord avec la bibliographie puisque la très grande majorité des EPS de microalgues et de Cyanobactéries possèdent des groupements sulfates (**Tableau 3**). On distingue les sPS avec des teneurs en sulfates faibles (< 5 %) ou moyennes (entre 5 et 9 %) et les sPS hautement sulfatés dont la teneur est  $\geq 10$  %. PSGN1 (*Glossomastix* RCC3688), PSCN (*Chrysotila dentata*) et PSEN appartiennent à la première catégorie puisqu'ils ont des teneurs égales à 8,9, 9,7 et 5,7 %, respectivement. La plupart des sPS décrits dans la bibliographie (**Tableau 3**) font partie de cette catégorie. Seuls 17 possèdent des teneurs  $\geq 10$  % (**Ge et al., 2014a, 2014b ; Kiemle et al., 2007 ; Percival & Foyle, 1979 ; Soanen et al., 2016 ; Magaletti et al., 2004 ; Yim et al., 2003 ; Tease et al., 1991 ; Richert et al., 2005 ; Majdoub et al., 2009 ; Sudo et al., 1995 ; Zhang et al., 2008**), auxquels s'ajoutent PSPN (*Pavlova*) et PSDN (*Diacronema*) (10,6 %), PSGN2 (*Glossomastix* RCC3707) (13,7 %) et PSSN (18,7 %).

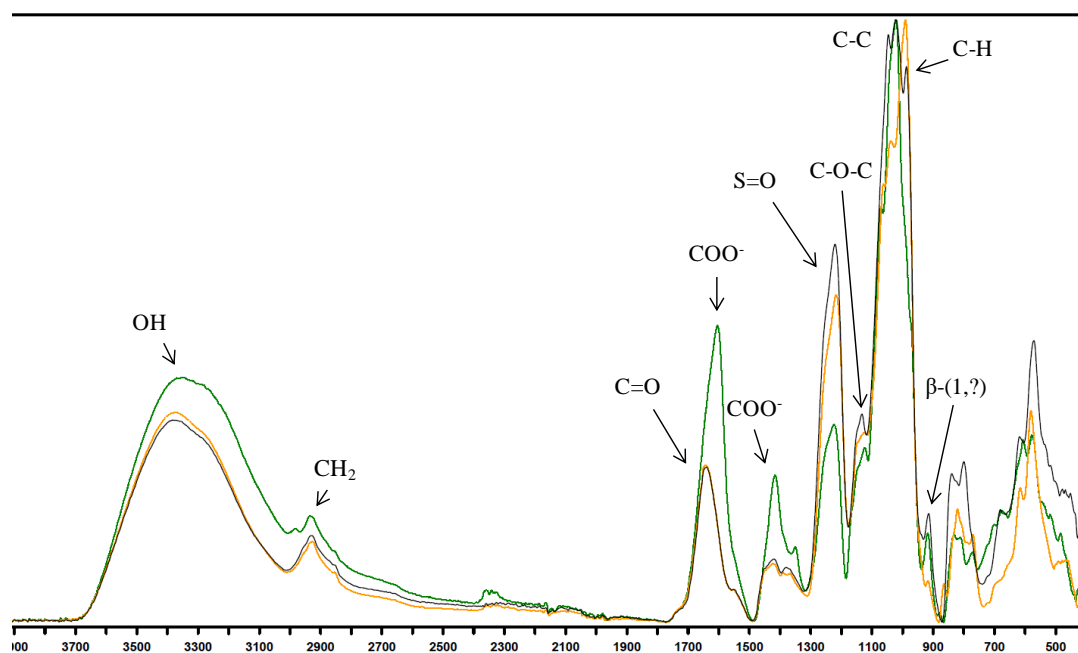
Tous contiennent également des protéines. Leur teneur varie d'un polymère à l'autre. Elle peut être relativement faible (3-4 %, PSDN et PSPN) ou extrêmement importante (17,7 et 25,2 % pour PSSN et PSCN). Les protéines font parties des « contaminants » les plus souvent rencontrés dans la composition des EPS de microalgues. Le terme protéoglycane est employé pour désigner les polymères liés par des liaisons covalentes aux protéines et **Capek et al. (2008)** ont désigné par cette appellation l'sPS extrait de *Rhodella grisea* comme un protéoglycane du fait de sa teneur protéique élevée (environ 13 %). A noter cependant que ces auteurs n'ont pas apporté la preuve de l'existence de liaisons covalentes entre les parties protéique et polysaccharidique au sein de ce composé. Cela est également le cas des polymères de *Microcoleus vaginatus*, *Scytonema javanicum* et *Arthrospira platensis* dont les protéines peuvent représenter 50, 50 et 55 % de la composition globale, respectivement (**Hu et al., 2003 ; Trabelsi et al., 2009**). Il faut néanmoins rester prudent car le mode de purification peut influencer de manière significative la teneur en protéines des EPS. Lors de l'élimination des sels des milieux de culture par dialyse ou ultrafiltration tangentielle, le seuil de coupure choisi peut conduire à la rétention plus ou moins importante de protéines. Une étape de précipitation alcoolique ultérieure peut permettre de diminuer significativement le taux de protéines dans les échantillons (**Moore & Tischer, 1964 ; Delattre et al., 2016**).

### 3.2 Analyses par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

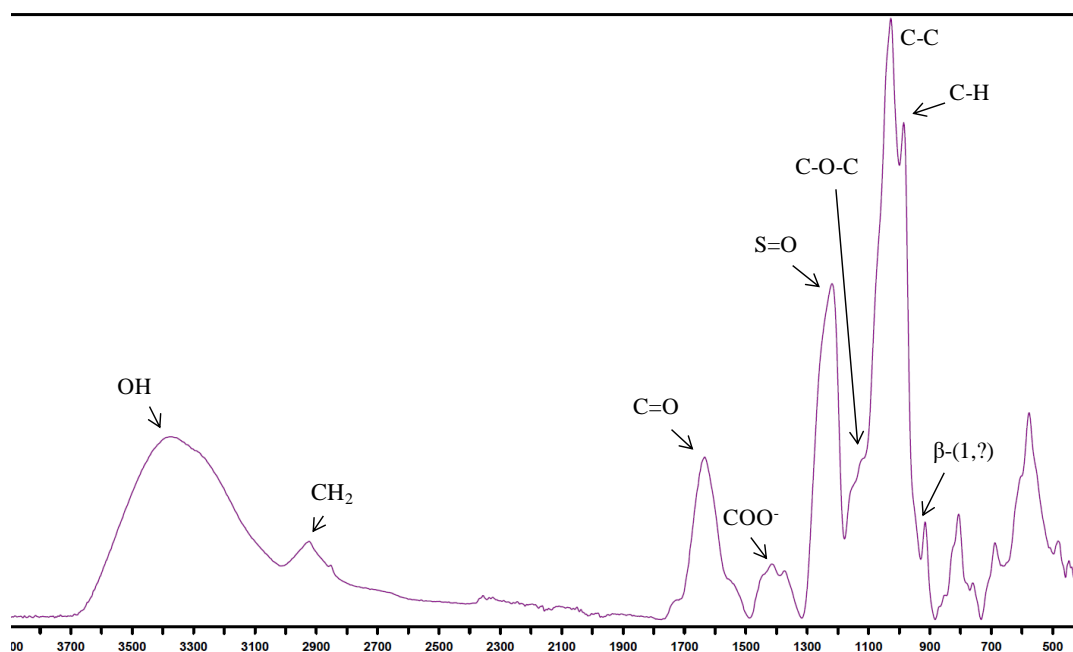
Les EPS ont été analysés par spectroscopie IR-TF (partie II.7.7). Cette méthode est largement utilisée pour la caractérisation partielle des PS (**Haxaire *et al.*, 2003**). Elle permet de révéler de manière qualitative la présence des groupes fonctionnels caractéristiques des PS, tels que les groupements sulfates. Les **Figures 46, 47 et 48** présentent les spectres des EPS entre 4000 et 400  $\text{cm}^{-1}$ . Leurs empreintes globales sont similaires confirmant la nature polysaccharidique des échantillons, mais avec des intensités de bandes d'absorption parfois variables. Tous les spectres montrent une large bande autour de 3350  $\text{cm}^{-1}$  correspondant à la vibration d'élongation des groupements hydroxyles (OH) des EPS, mais aussi des molécules d'eau résiduelles ou associées au PS (**Maréchal, 1997**). Le faible signal autour de 2925  $\text{cm}^{-1}$  est attribué à la vibration asymétrique du groupement  $\text{CH}_2$  (**Maréchal, 1997**). Des bandes caractéristiques des PS sont retrouvées entre 1200-800  $\text{cm}^{-1}$  (**Kacuráková *et al.*, 2000**). Elles correspondent aux vibrations des carbones des cycles pyranes, incluant les liaisons C-O-C, C-C et C-H à 1157-1133  $\text{cm}^{-1}$ , 1030-1022  $\text{cm}^{-1}$  et 988-985  $\text{cm}^{-1}$ , respectivement. Les bandes autour de 1601  $\text{cm}^{-1}$  et 1422-1415  $\text{cm}^{-1}$  montrent la présence de groupements carboxyles déprotonés ( $\text{COO}^-$ ) correspondant aux acides uroniques. Ces signaux sont particulièrement importants chez PSGN2 et PSEN. Ces résultats sont cohérents avec leur forte teneur en acides uroniques (26,7 et 27,1 %, respectivement). De plus, le signal observé autour de 1642-1634  $\text{cm}^{-1}$  pourrait correspondre à la vibration d'élongation des groupements C=O de la fonction carboxylique (**Manrique & Lajolo, 2002 ; Monsoor *et al.*, 2001 ; Gómez-Ordóñez & Rupérez, 2011**). La bande observée autour de 1219  $\text{cm}^{-1}$  est généralement attribuée aux vibrations d'élongation des groupements S=O, validant la présence des sulfates (**Chopin *et al.*, 1999**). Cette bande est très importante pour PSPN, PSDN et PSSN. Le signal à 1246  $\text{cm}^{-1}$  présent sur les spectres de PSGN1 et PSEN est généralement attribué aux groupements acétyles. Cependant ceux-ci n'ont pas été recherchés dans le cadre de cette étude. Enfin, le signal observé autour de 916-897  $\text{cm}^{-1}$  suggère une conformation majoritaire de type  $\beta$  pour les anoméries des résidus engagés dans les liaisons glycosidiques de la chaîne principale de certains PS (**Deng *et al.*, 2013 ; Tomar & Adaganti, 2013**). Cette bande est absente chez PSCN et PSEN, relativement faible chez PSDN et clairement visible pour les autres.



**Figure 46 :** Spectres IR-TF de PSGN1 (*Glossomastix* RCC3688) (●), PSEN (*Exanthemachrysis*) (●) et PSCN (*Chrysotila dentata*) (●).



**Figure 47 :** Spectres IR-TF de PSPN (*Pavlova*) (●), PSDN (*Diacronema*) (●) et PSGN2 (*Glossomastix* RCC3707) (●).

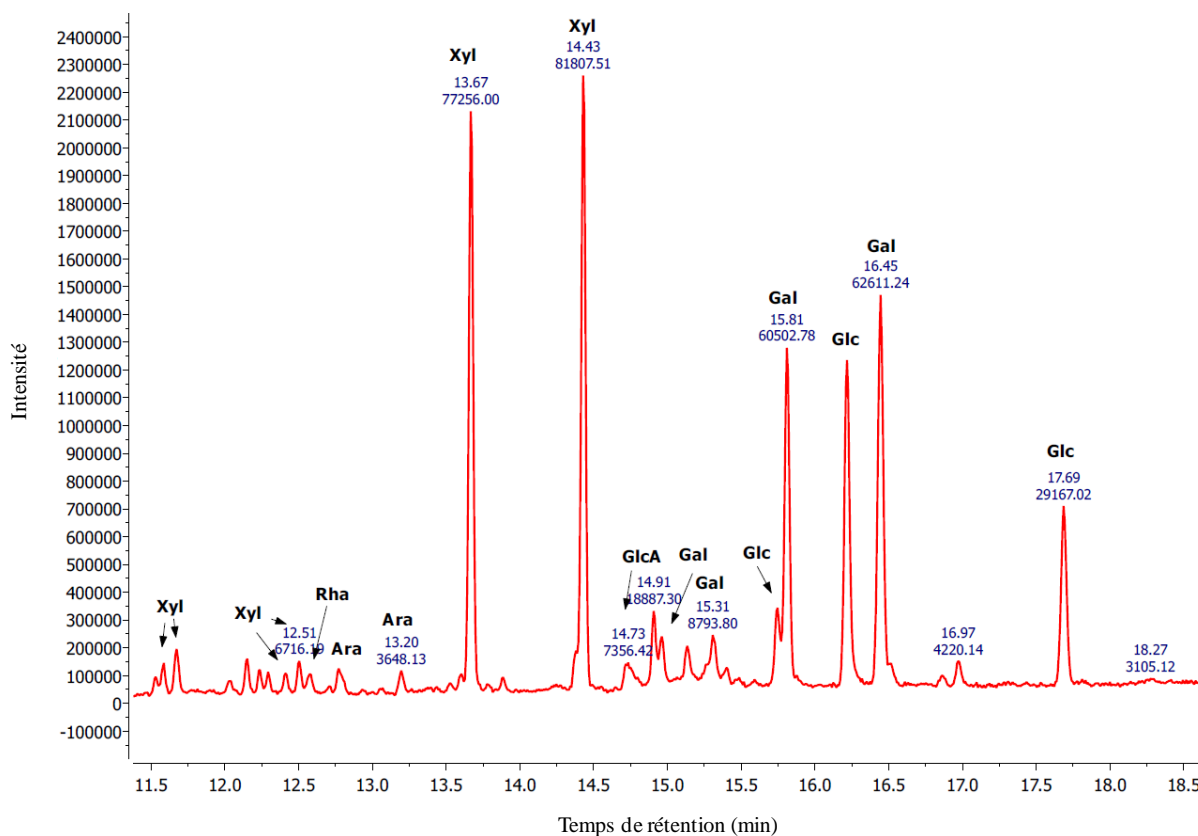


**Figure 48** : Spectres IR-TF de PSSN (*Synechococcus*) (●).

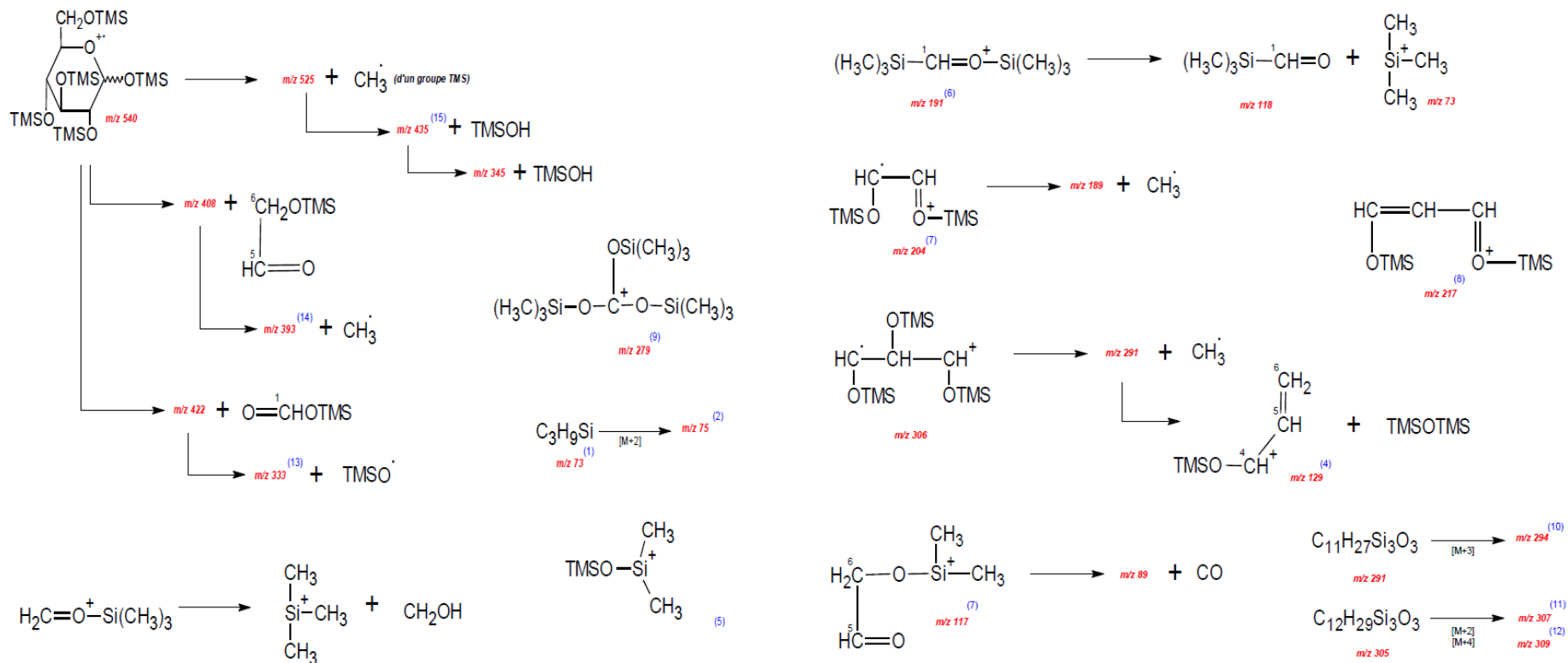
### 3.3 Compositions en monosaccharides des EPS

La détermination de la composition en oses d'un EPS peut être sensiblement différente en fonction de la méthode analytique utilisée. Elle est également impactée par le protocole mis en œuvre pour préparer l'échantillon. En effet, en fonction de la composition du polymère, la procédure d'hydrolyse par des acides minéraux peut entraîner une sous-estimation de certains monosaccharides, et donc une surestimation des autres lorsque les résultats sont exprimés en ratios molaires (**Delattre *et al.*, 2016**). Les conditions d'hydrolyses aux TFA 2 M (120 °C, 90 min) et 4 M (100 °C, 240 min) permettent d'obtenir les meilleurs résultats puisque les quantifications des aldoses, pentoses et hexosamines sont quantitatives et que celle des acides uroniques est partiellement quantitative (**Delattre *et al.*, 2016**). Les compositions en monosaccharides ont été déterminées par CEAHP-DAP et CPG/SM-IE (partie II.8.1). La séparation des molécules en CEAHP-DAP s'effectue à l'aide de gradients de NaOH et d'acétate de sodium. Dans ces conditions très alcalines, les monosaccharides se transforment en alcoolates susceptibles d'être retardés spécifiquement dans une colonne échangeuse d'anions et ainsi avoir des temps de rétention différents. L'identification des différents glycosides-*O*-triméthylsilyles par CPG/SM-IE va dépendre de leur temps d'élution mais également du rapport masse/charge qualifié de rapport *m/z*. La **Figure 49** montre le chromatogramme obtenu pour PSGN1. Les voies de fragmentation en impact électronique des

glycosides-*O*-triméthylsilyles sont connues depuis longtemps dans la littérature (**Figure 50, DeJongh *et al.*, 1969 ; Kamerling 2007**). Les rapports  $m/z$  204 et  $m/z$  217 sont des éléments importants à prendre en compte. Un rapport  $m/z$  204/217  $\geq 1$  indique la présence d'un cycle pyranique. A l'inverse, un rapport  $m/z$  204/217  $< 1$  indiquera la présence d'un cycle furanique.



**Figure 49** : Chromatogramme obtenu pour PSGN1 après analyse par CPG/SM-IE (70 eV). Ara : arabinose, Xyl : xylose, Rha : rhamnose, Gal : galactose, Glc : glucose, GlcA : acide glucuronique.



**Figure 50 :** Voies de fragmentation des dérivés glycosides-*O*-triméthylsilyles par CPG/SM-IE (70 eV) (Benaoun, 2017).

Les résultats des compositions en monosaccharides obtenus par CEAHP-DAP et CPG/SM-IE sont présentés dans le **Tableau 17**. Les teneurs en GalA et GlcA sont très souvent plus importantes en CEAHP-DAP, et le GalA n'est quasiment jamais quantifié en CPG/SM-IE. Néanmoins, les monosaccharides principaux sont similaires avec les deux méthodes.

**Tableau 17** : Compositions en monosaccharides des EPS traités par hydrolyse au TFA 2M et analysés par CEAHP-DAP et CPG/SM-IE (exprimées en ratio molaire).

EPS	Méthodes	Fuc	Ara	Rha	Gal	Glc	Xyl	Man	GalA	GlcA
PSGN1 <i>Glossomastix</i> (RCC3688)	CEAHP-DAP	0,7	2,5	0,3	31,7	14,1	45,3	0	0,3	5,2
	CPG/SM-IE	0	2,6	0,7	22,8	12,2	54,1	0	0	7,5
PSCN <i>Chrysotila dentata</i> (CCAP904/1)	CEAHP-DAP	3,5	28,4	1,6	37,8	0	19,4	4,2	1	4,2
	CPG/SM-IE	0	38	0	36,2	1,3	17,4	6,7	0	0,4
PSPN <i>Pavlova</i> (RCC3438)	CEAHP-DAP	0,5	7,8	37,8	23,1	19,8	5,1	0	2,5	3,6
	CPG/SM-IE	0	0	50,4	23,4	17,8	0	0	0	8,4
PSDN <i>Diacronema</i> (RCC3514)	CEAHP-DAP	0,8	6,8	31,7	22,6	19,3	14,5	0	0,7	3,5
	CPG/SM-IE	0	6,3	40,3	22,9	21,7	0	0	0	8,8
PSEN <i>Exanthemachrysis</i> (RCC1544)	CEAHP-DAP	0	9,7	1,5	7,8	6,1	20,6	15,3	3,8	35,4
	CPG/SM-IE	0	15,4	2,6	14,8	5,3	11,5	12,5	0	38
PSGN2 <i>Glossomastix</i> (RCC3707)	CEAHP-DAP	43,7	0,3	27,5	3,8	0	0,5	0	18,8	5,5
	CPG/SM-IE	40,1	0	30,7	2,4	0	0	0	21,2	5,6
PSSN <i>Synechococcus</i> (RCC2380)	CEAHP-DAP	19,6	0,4	0,3	28,3	50,4	0	0	0,7	0,4
	CPG/SM-IE	24	0	0	38	38	0	0	0	0

PSSN est un glucane composé de Glc (38-50 %), Gal (28-38 %) et Fuc (20-24 %). Cette composition est similaire à celle décrite précédemment malgré le changement de milieu de culture (milieu f/2 modifié) et des paramètres opératoires pour la culture. Cependant, les résultats montrent que le polymère ne contient pas d'acides uroniques, contrairement à ce que suggéraient les résultats du dosage des oses acides et le spectre IR-TF. Les quantités d'acides uroniques déterminées par le dosage colorimétrique sont très souvent supérieures à la somme des ratios molaires du GlcA et GalA déterminées en CPG/SM-IE et CEAHP-DAP. Cela est cohérent avec l'hypothèse de l'existence d'un biais dans le dosage colorimétrique. Cependant, cela n'explique pas la présence d'une bande vers 1422-1415 cm<sup>-1</sup> en IR-TF. Les analyses en CPG/SM-IE et CEAHP-DAP étant plus qualitatives et précises, on peut en conclure que PSSN est dépourvu d'acide uronique et que le pic obtenu en IR-TF est dû à la présence de fonctions carboxyliques non associées à la présence d'acides uroniques. Dans l'ensemble, cette composition est en accord avec celle des autres EPS de Cyanobactéries puisque le Glc est le monosaccharide principal dans 48 compositions, et secondaire dans 14 autres (**Tableau 3**). De plus, le Gal correspond au monosaccharide secondaire dans 12 EPS. Néanmoins on remarque qu'il se distingue des autres polymères par sa teneur en Fuc. A ce jour, seuls 5 EPS de Cyanobactéries ont été décrits avec des teneurs importantes en Fuc (**Panoff et al., 1988 ; Li et al., 2001 ; Richert et al., 2005 ; Rossi et al., 2012 ; Sudo et al., 1995**).

PSGN2 est majoritairement composé de Fuc (40-44 %), Rha (27-31 %) et GalA (19-21 %), avec quelques autres monosaccharides. Cette composition ne ressemble à aucune autre des EPS présents dans le **Tableau 3**. L'EPS de *Chaetoceros decipiens* est celui dont la composition s'en rapproche le plus avec une richesse en Rha et Fuc (**Urbani et al., 2012**). Néanmoins, la forte teneur en GalA du PSGN2 le rend très particulier et inédit du point de vue de sa composition en monosaccharides. Les sPS riches en Fuc sont appelés fucanes (teneur en L-fucose  $\geq 80$  %) ou fucoïdanes (L-fucose majoritaire mais présence d'autres monosaccharides formant une structure hétérogène et complexe) (**Berteau & Mulloy, 2003**). Ainsi, la richesse en Fuc de PSGN2, couplée à son taux de sulfates élevé (13,7 %) et son taux de protéines faible (4,4 %) en font un polymère particulièrement attractif pour la recherche d'activités biologiques. De plus, son taux en GalA (19-21 %) le classe parmi les PS anioniques.

PSCN est majoritairement composé de Gal (36-38 %), Ara (28-38 %) et Xyl (17-19 %), avec la présence d'autres monosaccharides en plus faibles proportions. Cette composition

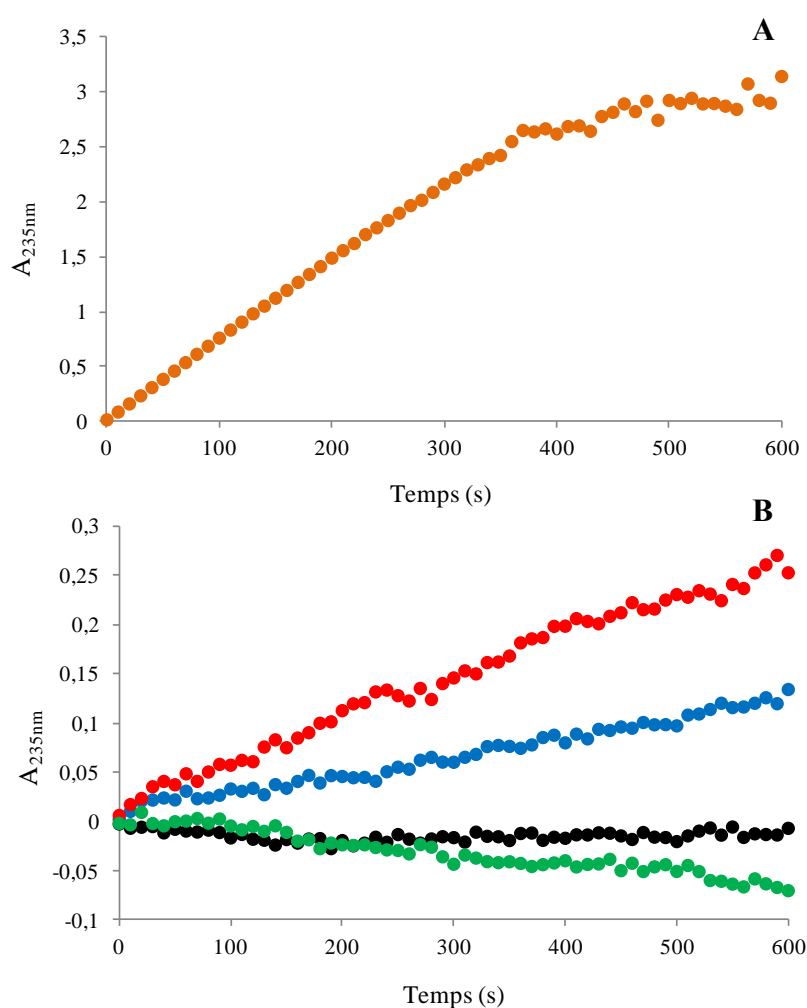


suggère que le polymère pourrait être un galactoarabinane. D'autres EPS essentiellement composés de Ara et Gal sont déjà produits par certaines microalgues telles que *Chlamydomonas corrosa*, *Chlamydomonas sajabo*, *Chlorella mirabilis* et *Penium spirostriolatum* (Allard & Tazi, 1992 ; Barclay & Lewin, 1985 ; Barberousse *et al.*, 2006 ; Kiemle *et al.*, 2007).

PSDN et PSPN sont majoritairement composés de Rha (32-40 % et 38-50 %, respectivement), Gal (23 % pour les deux) et Glc (19-22 % et 18-20 %, respectivement). En prenant en compte les résultats de la composition globale, on remarque qu'ils possèdent également la même teneur en sulfates et un taux similaire de protéines. Ainsi, ces EPS sont très proches du point de vue de leur composition biochimique. Ils pourraient s'agir de galactorhamnanes sulfatés. A ce jour aucune microalgue n'a été identifiée comme productrice d'un EPS ayant une composition similaire. Chez les Cyanobactéries, seules *Stichococcus Bacillaris* et *Oscillatoria ambiguum* produisent des EPS riches en Rha et Gal (Barberousse *et al.*, 2006).

L'analyse par CPG/SM-IE révèle une composition très hétérogène du polymère PSEN. Ce dernier est composé de GlcA (38 %), Ara (15,4 %), Gal (14,8 %), Man (12,5 %) et Xyl (11,5 %). A l'inverse, la composition identifiée en CEAHP-DAP est moins hétérogène, avec majoritairement du GlcA (35,4 %), Xyl (20,6 %) et Man (15,3 %). Les autres monosaccharides sont présents en plus faibles proportions (< 10 %). Malgré ces nuances, probablement liées à la nature du polymère et aux méthodes analytiques différentes, les résultats montrent que le GlcA est le monosaccharide principal de ce polymère. Notons que les PS composés principalement de GlcA, appelés glucuronanes, sont originaux et peu décrits à l'état naturel. Seuls 4 EPS de microalgues et de Cyanobactérie ont déjà montré une richesse en GlcA. Les teneurs étaient égales à 22,1, 28, 35,8 et 55 % dans les EPS de *Nostoc insulare*, *Chlamydomonas agustae*, *Closterium* sp. et *Amphora* sp., respectivement (Fischer *et al.*, 1997 ; Allard & Tazi, 1992 ; Jin *et al.*, 2018 ; Domozych *et al.*, 1993). Les glucuronanes, PS possédant un DP d'au moins 3 résidus de GlcA reliés par une liaison  $\beta$ -(1,4) sont par ailleurs très attractifs pour leur propriétés biologiques et rhéologiques (Elboutachfaiti *et al.*, 2011). Deux lots d'EPS ont été produits à partir de la souche *Exanthemachrysis* (RCC1544) : le premier est issu d'une culture en milieu « f/2 modifié » en erlenmeyer (20 °C, 120 rpm, cycle jour/nuit de 16 h/8 h à 150  $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) et le second correspond au PSEN. Des tests enzymatiques avec une glucuronane lyase fongique (EC 4.2.2.14, Tavernier *et al.*, 2008) ont été effectués sur ces deux lots de PS afin de valider la nature de type glucuronane du

polymère. Cette enzyme est capable de cliver les liaisons  $\beta$ -(1,4) entre deux GlcA, avec un DP minimal de 3 résidus. L'activité enzymatique peut être suivie par des mesures à 235 nm correspondant aux insaturations (C=C) formées lors du clivage de la liaison glycosidique par le mécanisme de  $\beta$ -élimination (**Figure 51**). Les résultats confirment que l'EPS produit par la souche *Exanthemachrysis* (RCC1544), dans les conditions de culture en erlenmeyer possède des segments d'au moins 3 acides D-glucuroniques liés en  $\beta$ -(1,4). Le même test, réalisé sur le PSEN n'a pas été concluant. L'activité glucuronane lyase était non mesurable en raison d'une fluctuation du signal suggérant la présence d'un insoluble de type gel une fois le polysaccharide remis en solution.



**Figure 51** : Activités enzymatiques de la glucuronane lyase (0,166 U/ $\mu$ L) testée sur (A) un glucuronane bactérien (2 g.L<sup>-1</sup>) + 2  $\mu$ L d'enzyme, et (B) l'EPS extrait d'une culture en erlenmeyer de *Exanthemachrysis* (RCC1544) (2 g.L<sup>-1</sup>), (●) : EPS + 2  $\mu$ L d'enzyme, (●) : EPS + 4  $\mu$ L d'enzyme, (●) : EPS seul, (●) : EPS + 4  $\mu$ L d'enzyme dénaturée.

Les fortes propriétés chélatrices des glucuronanes nous ont amené à réaliser un traitement à l'EDTA ( $3,33 \times 10^{-3}$  M) pendant 1 nuit à 4 °C du même EPS en solution. Après dialyse de la solution l'activité enzymatique de la glucuronane lyase n'a pu être détectée du fait d'un maintien d'une fluctuation du signal malgré la disparition du gel polysaccharidique.

Pour les 5 souches citées précédemment, les compositions en monosaccharides sont similaires à celles obtenues lors des cultures en erlenmeyer (**Tableaux 15 et 17**). Par conséquent la montée en échelle en PBR (ou airlift) n'a pas affecté significativement la composition des polymères.

PSGN1 est majoritairement constitué de Xyl (45-54 %), Gal (23-32 %) et Glc (12-14 %), et d'autres monosaccharides en plus faibles quantités. La composition du polymère suggère qu'il pourrait s'agir d'un galactoxylane. Ce type de polymère est essentiellement retrouvé chez des microalgues rouges telles que *Flintiella sanguinaria*, *Rhodella maculata* et *Porphyridium* sp. (**Roussel et al., 2015 ; Gaignard et al., 2018 ; Soanen et al., 2016 ; Geresh et al., 2009 ; Percival & Foyle, 1978**). Ces polymères possèdent un haut potentiel car porteurs de nombreuses activités biologiques (**Tableau 18**).

La composition de PSGN1 est complètement différente de celle du sPS obtenu lors des cultures en erlenmeyer. En effet, ce dernier contenait du Fuc (54-57 %), Rha (20-28 %) et des acides uroniques (5-11 % de GalA et 9-10 % de GlcA). Ce changement complet de composition n'a pas été observé pour PSGN2 qui est également produit par une microalgue *Glossomastix*, mais pour lequel la production en plus gros volume a été réalisée en bouteilles airlift. L'hypothèse la plus probable pour expliquer ce changement est qu'une contamination par une autre souche de microalgue, les deux cultures étant issus de lots différents. Cette souche contaminante aurait alors été responsable de la production du potentiel galactoxylane.

La deuxième hypothèse serait que les conditions de cultures spécifiques au PBR auraient peut-être affectées la composition du polymère. Les paramètres de culture/production d'EPS en erlenmeyer des souches *Glossomastix* (RCC3688 et RCC3707), en PBR (*Glossomastix* (RCC3688)) et en bouteilles airlift (*Glossomastix* (RCC3707)) sont présentés dans le **Tableau 19**.

**Tableau 18** : Activités biologiques des sPS extraits de *Porphyridium*.

<b>Espèces</b>	<b>Activités</b>	<b>Références</b>
<i>Porphyridium</i> sp., <i>Porphyridium cruentum</i>	Antioxydant	Sun <i>et al.</i> (2009) ; Tannin-Spitz <i>et al.</i> (2005)
<i>Porphyridium cruentum</i>	Anticancéreux	Gardeva <i>et al.</i> (2009) ; Sun <i>et al.</i> (2012) ; Geresh <i>et al.</i> (2002)
<i>Porphyridium cruentum</i>	Immunomodulateur	Sun <i>et al.</i> (2012)
<i>Porphyridium</i> sp.	Anti-inflammatoire	Matsui <i>et al.</i> (2003)
<i>Porphyridium</i> sp., <i>Porphyridium cruentum</i>	Antiviral	Huheihel <i>et al.</i> (2001, 2002) ; Huang <i>et al.</i> (2005)
<i>Porphyridium cruentum</i>	antibactérien	Raposo <i>et al.</i> (2014)
<i>Porphyridium marinum</i> , <i>Porphyridium purpureum</i>	Antiparasitaire	Roussel <i>et al.</i> (2015)
<i>Porphyridium</i> sp.	Hypocholestérolémiant	Dvir <i>et al.</i> (2009)
<i>Porphyridium cruentum</i>	Hypoglycémique	Huang <i>et al.</i> (2006)
<i>Porphyridium cruentum</i>	Anti-âge	Bayona <i>et al.</i> (2012)
<i>Porphyridium</i> sp.	lubrifiant	Arad & Weinstein (2003)

**Tableau 19** : Comparaison des conditions de culture pour la production d'EPS des souches *Glossomastix* (RCC3688) et (RCC3707).

Paramètres de culture	<i>Glossomastix</i> (RCC3688 et RCC3707) Erlenmeyer	<i>Glossomastix</i> (RCC3688) PBR 5 L	<i>Glossomastix</i> (RCC3707) Bouteille airlift
Milieu de culture	f/2 modifié	f/2 enrichi	f/2 enrichi
Irradiance ( $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )	150	150-350	40
Cycle jour/nuit	16 h/8 h	non	16 h/8 h
Supplémentation CO <sub>2</sub>	non	1-3 %	non
Agitation mécanique	120 rpm (agitation orbitale)	120 rpm (turbines rushton)	non
pH	Pas de régulation	8-8,5	Pas de régulation
Température	20 °C	20-24 °C	20 °C

Les milieux de culture sont similaires, seules les teneurs en azote et en phosphore varient (f/2 modifié vs f/2 enrichi). Il en est de même pour la température (proche de 20 °C dans les trois conditions de culture). Ces paramètres environnementaux sont donc à exclure.

Par contre, le cisaillement était plus important lors de la culture en PBR (agitation mécanique par des turbines rushton) par rapport aux cultures en erlenmeyers et airlift, de même que le flux lumineux (absence de cycle jour/nuit et irradiance jusqu'à 350  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  en PBR) et l'apport de CO<sub>2</sub> (1-3 %). Le pH n'ayant pas pu être maintenu dans la culture en erlenmeyer contrairement à la culture en PBR, son augmentation provoqué par la production d'O<sub>2</sub> via la photosynthèse et la consommation des ions NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (García *et al.*, 2006 ;

**Markou et al., 2014**) aurait peut-être pu entraîner un changement de métabolisme chez *Glossomastix* (RCC3688), conduisant à une production d'EPS différents.

La composition de l'EPS observée après culture en PBR montre une teneur élevée en Xyl. Les xylanes étant fréquemment retrouvés dans la paroi cellulaire des plantes où ils confèrent une certaine rigidité, il pourrait s'agir d'un mécanisme de protection des cellules afin de résister au stress mécanique. Néanmoins, aucune donnée bibliographique n'est disponible concernant l'impact du cisaillement sur la composition en monosaccharides d'EPS de microalgues et de Cyanobactéries.

Concernant les autres paramètres opératoires, même si différents auteurs proposent des compositions différentes pour des EPS issus de la même espèce, il est souvent difficile de pouvoir conclure à un lien avec les conditions de culture, les méthodes d'extraction/purification et d'analyse pouvant également conduire à des compositions différentes.

Dans le milieu naturel, la composition des EPS pourrait varier en fonction de la saisonnalité, en lien avec des variations des paramètres environnementaux tels que la température, la lumière, l'hydrodynamique ou les nutriments présents dans l'environnement. En conditions de cultures contrôlées, ce type de modifications a été mise en évidence par quelques auteurs. Ainsi, **Underwood et al. (2004)** ont mis en évidence des modifications de composition de l'EPS de la diatomée *Cylindrotheca closterium* produit en conditions standard ou de carence en azote. Des observations similaires ont été observées chez les diatomées *Cylindrotheca fusiformis*, *Thalassiosira pseudonana* et *Skeletonema costatum* avec la limitation en phosphore (**Magaletti et al., 2004 ; Urbani et al., 2005**).

Récemment, **Phélippé et al. (2019)** ont réalisé une méta-analyse des données bibliographiques concernant la Cyanobactérie *Arthrospira platensis* (incluant EPS et BPS). L'étude a été complétée par des données expérimentales pour des cultures conduites à différentes intensités lumineuses. Ainsi, les EPS obtenus à forte irradiance contiennent davantage de Glc, au détriment des autres oses neutres et des acides uroniques. Néanmoins, les modifications observées dans l'ensemble de ces études suggèrent une modulation de la composition des EPS et BPS avec la modification des ratios molaires en monosaccharides, et ne décrivent pas de changement aussi radical de la composition que celle observée dans ce travail. Cette hypothèse reste donc à vérifier.

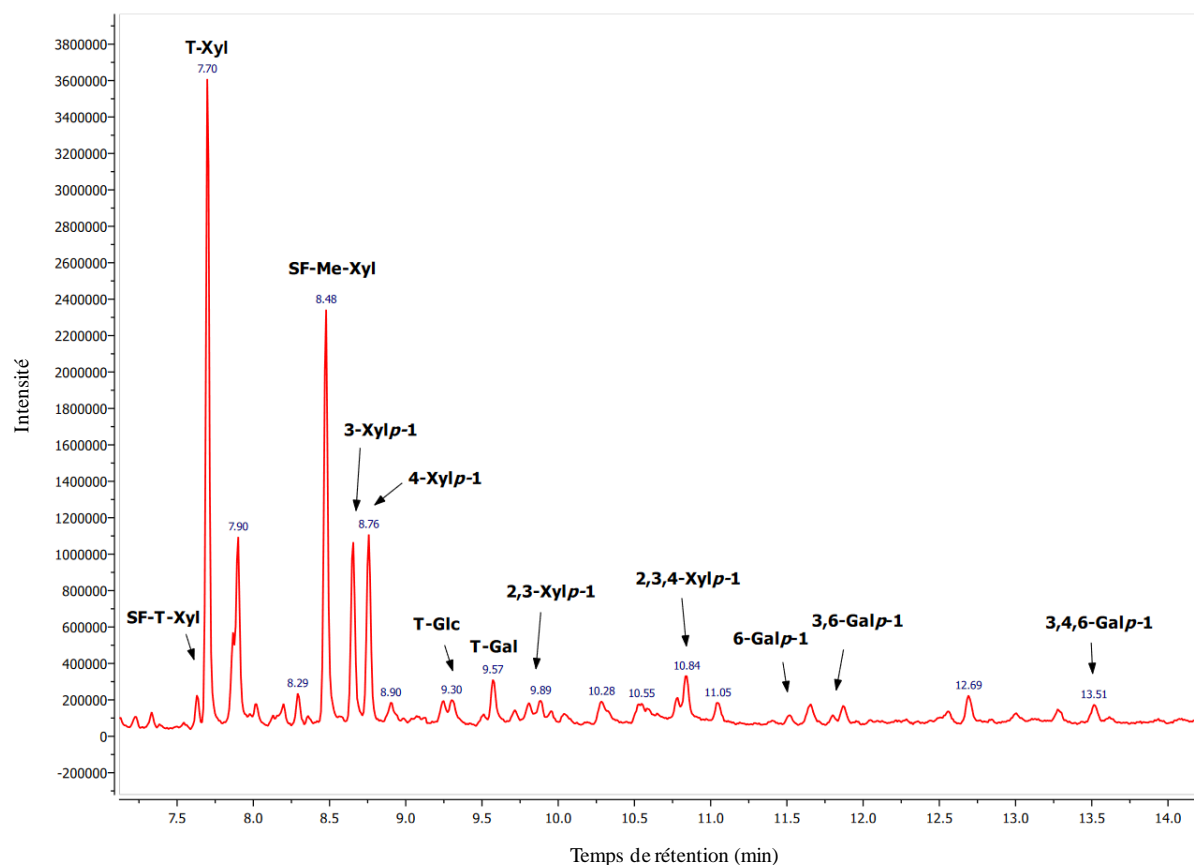
### 3.4 Détermination des liaisons glycosidiques au sein de PSGN1

Les résultats précédents ont mis en évidence que PSGN1 (*Glossomastix* RCC3688) était majoritairement composé de Xyl et de Gal, et sulfaté à hauteur de 8,9 %. Une étude des liaisons glycosidiques par CPG/SM-IE a été entreprise (partie II.8.1.3). La **Figure 52** présente le chromatogramme obtenu par l'analyse des Acétates d'Alditol Partiellement *O*-Méthylés (AAPM) et les spectres de masse des principaux fragments en impact électronique. Le profil des AAPM et la détermination des liaisons glycosidiques du PSGN1 sont présentés dans le **Tableau 20**.

Les résultats montrent que les principaux résidus sont le 1,4-Xylp (18,1 %), 1,3-Xylp (17,9 %), T-Glcp (9,2 %), 1,6-Galp (8,96 %) et 1,3,4,6-Galp (8,5 %). Les sommes totales des résidus AAPM Xyl, Gal et Glc/GlcA représentent 51,6, 28,5 et 16,6 %, respectivement. Ce résultat est cohérent avec la composition en monosaccharides déterminée précédemment par CPG/SM-IE. Ces liaisons seraient présentes en quantités similaires puisque les résidus ont un ratio 1 : 1. De plus, certains de ces résidus semblent porter des groupements sulfates, tout comme les résidus terminaux  $-(\alpha/\beta)\text{-D-Xylp-(1}\rightarrow$ . Il n'est pas possible de déterminer précisément leur position par CPG/SM-IE sans réaliser une analyse du polymère désulfaté. Le polymère apparaît comme ramifié en positions *O*-2 et *O*-3 par diverses chaînes et/ou résidus terminaux tels que D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 6)-D-Galp, D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Galp, D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 3)-D-Galp, Galp-(1 $\rightarrow$ , SF-Xylp-(1 $\rightarrow$ , Xylp-(1 $\rightarrow$  et Glcp-(1 $\rightarrow$ . Les positions terminales sont occupées par des résidus Xylp (6 %), Galp (6,3 %), Glcp et/ou GlcAp (9,24 %). Compte tenu de la structure de la chaîne principale, il est probable que ces résidus terminaux se trouvent sur les ramifications. Le ratio des résidus terminaux totaux (21,5 %) est proche de celui des résidus ramifiés (23 %), mettant en évidence la bonne attribution et quantification des ramifications le long de la chaîne principale de PSGN1. Les résultats montrent que le polymère est un hétéroxylane et que son squelette pourrait être composé d'une chaîne principale de  $\beta\text{-(1,3)-}$  et  $\beta\text{-(1,4)-D-Xylp}$ .

Du fait de l'absence d'unités de répétition et la présence régulière de substituants non sucre conduisant à des structures d'EPS complexes, peu de données sur les liaisons glycosidiques des EPS de microalgues et Cyanobactéries sont disponibles dans la littérature comme décrit dans la synthèse bibliographique (partie I.3.4.2.3, **Tableaux 3** et **4**). Les résultats présentés ici, bien que nécessitant d'être complétés par d'autres analyses afin d'obtenir par exemple des informations précises sur l'enchaînement des monosaccharides

apportent déjà des informations importantes sur la structure du polymère (résidus terminaux, carbone engagé dans la liaison glycosidique entre autres). Ces données présentent également un intérêt dans le contexte des tests rhéologiques et biologiques car elles apportent des informations pour la mise en relation de la structure avec une fonction.



**Figure 52, partie 1** : Chromatogramme des ions totaux des AAPM du PSGN1 obtenus après hydrolyse puis triméthysilylation et mesurés par CPG/SM-IE.



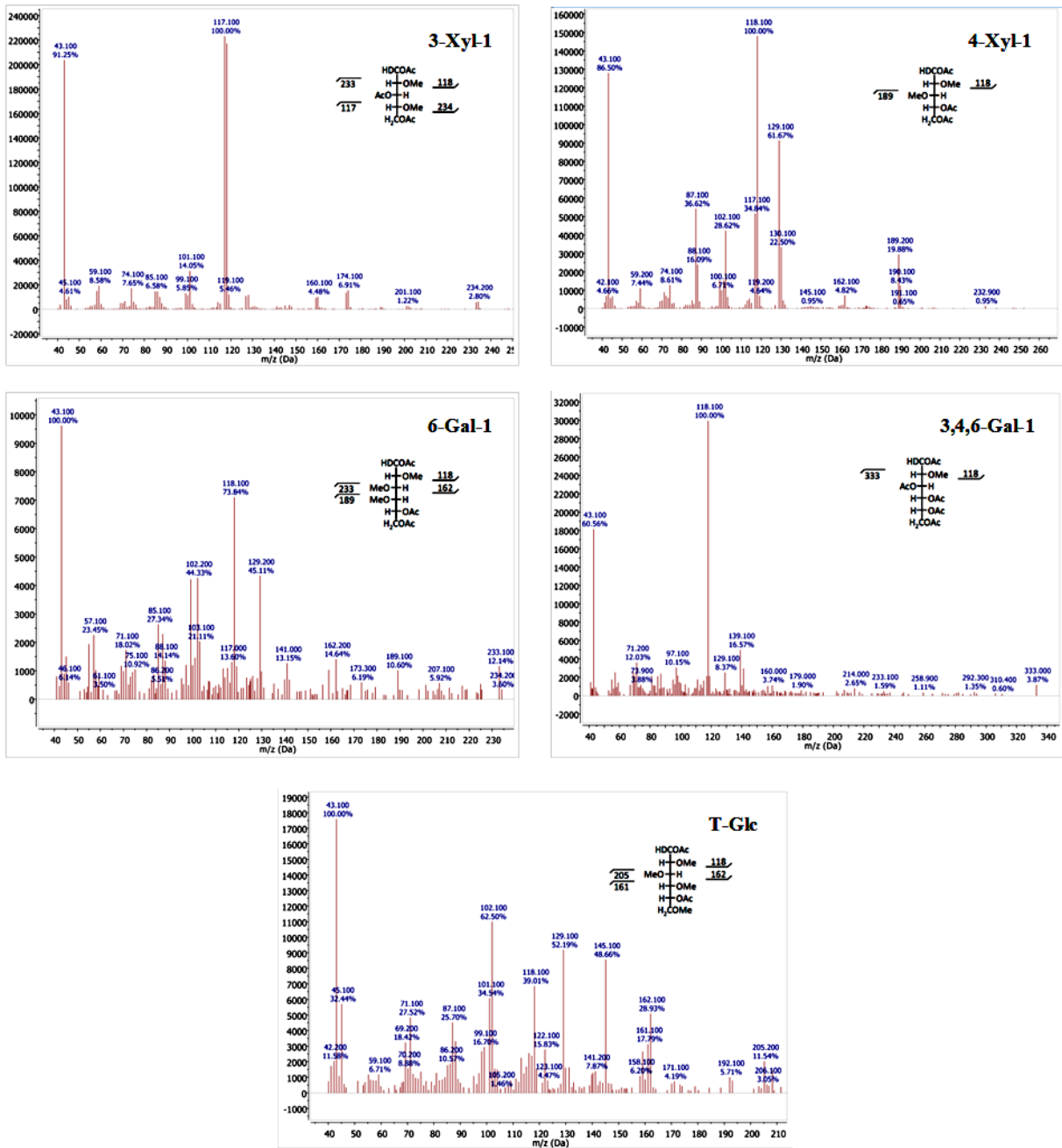


Figure 52, partie 2 : Spectres de masse des principaux fragments en impact électronique obtenus lors de l'analyse par CPG/SM-IE du PSGN1 après hydrolyse et triméthysilylation.

**Tableau 20 :** Profil des Acétates d'Alditol Partiellement *O*-Méthylés (AAPM) et détermination des liaisons glycosidiques du PSGN1, obtenus en CPG/SM-IE après méthylation et acétylation.

Acétates d'Alditol Partiellement <i>O</i> -Méthylés <sup>(a)</sup>	% <sup>(b)</sup>	Linkage type <sup>(c)</sup>
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	6,3	Galp-(1→
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Gal	8,96	→6)-Galp-(1→
2,4-Me <sub>2</sub> -Gal	4,76	→3,6)-Galp-(1→
2-Me-Gal	8,52	→3,4,6)-Galp-(1→
<i>total</i>	<b>28,5</b>	
SF <sup>(d)</sup> -2,3,4-Me <sub>3</sub> -Xyl	nd	SF-Xylp-(1→
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Xyl	6,0	Xylp-(1→
2,4-Me <sub>2</sub> -Xyl	17,9	→3)-Xylp-(1→
2,3-Me <sub>2</sub> -Xyl	18,1	→4)-Xylp-(1→
SF <sup>d</sup> -Me <sub>2</sub> -Xyl	nd	→3)-SF-Xylp-(1→ et/ou →4)-SF-Xylp-(1→
4-Me-Xyl	3,2	→2,3)-Xylp-(1→
SF-Me-Xyl	nd	Multiple résidus
Xyl	6,49	→2,3,4)-Xylp-(1→
<i>total</i>	<b>51,6</b>	
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	9,24	Glc p-(1→
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Glc	trace	→6)-Glc p-(1→
Fragments d'acétate de glucitol	7,38	nd
<i>Total<sup>(e)</sup></i>	<b>16,6</b>	
Fragments d'acétate d'arabinitol	3,22	nd
<i>total</i>	<b>3,62</b>	

Toutes les analyses ont été réalisées en duplicata (écart-types relatifs < à 5 %)

<sup>(a)</sup> 2,3,4-Me<sub>3</sub>-Glc=2,3,4-tri-*O*-méthyle-glucitol-acétate, etc.

<sup>(b)</sup> % de l'aire des pics d'acétates d'alditol *O*-méthylés par rapport à l'aire totale, déterminée par GC-MS

<sup>(c)</sup> déterminé par les dérivés d'acétates alditol *O*-méthylés

<sup>(d)</sup> SF : présence de groupements sulfates

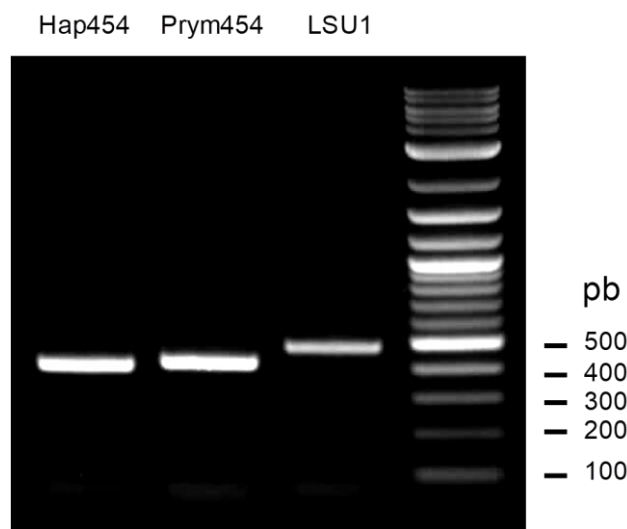
<sup>(e)</sup> correspond à la fois aux Glc p et Glc Ap

nd : non déterminé

## 4. Identification des souches

### 4.1 Souche RCC4633

La microalgue RCC4633 est enregistrée sous la dénomination « Haptophyta ». Elle a été identifiée comme productrice d'EPS lors du criblage, et confirmée pour le phénotype [EPS<sup>+</sup>] lors des analyses de la composition en monosaccharides des EPS isolés (partie III.1.2). Dans l'optique d'une éventuelle production à plus grande échelle, une identification plus précise du genre auquel elle appartient s'est révélée nécessaire. L'identification a été réalisée par séquençage des gènes codant pour les ARNr 18S et 28S après extraction de l'ADN et amplification par PCR (partie II.2.1). L'estimation des masses moléculaires des fragments d'ADN a été déterminée par électrophorèse sur gel d'agarose en présence de standards (**Figure 53**). Les produits de PCR obtenus après amplifications avec les couples d'amorces Hap454 et Prym454 font 400 pb et celui amplifié avec LSU1 fait 500 pb.



**Figure 53** : Migration sur gel d'agarose des produits PCR obtenus à partir des couples d'amorces Hap454, Prym454 et LSU1 sur de l'ADN total issu de la souche RCC4633. Les couples d'amorces spécifiques du gène de l'ARNr 18S ont été sélectionnés à partir de **Edge et al. (2013)** et celui spécifique du gène de l'ARNr 28S à partir de **Bittner et al. (2013)**.

Les produits de PCR ont été séquencés (**Figure 54**) puis les séquences ont été alignées avec celles disponibles dans la base de données NCBI (« *Centre National américain pour les Informations Biotechnologiques* »).

**Séquence 1 : amplifiat 528long/PRYM01+7 (Hap454)**

TAATTCCAGCTCCAGTAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTGAAACGCTCGTAGTCGGATT  
TCGGGTCGGTTGCGCCGGTCTGCCGTTGGGTATGCACTGGCGGAGTCGTCCTTTCTTCCGG  
AGACCGCGCCTCCTCTTAGCTGAGCGGGTGCGGGAGACGGATCGTGTACTTTGAAAAAAT  
CAGAGTGTTCAGGCAGGCAGCTCGCTCTTGCATGGATTAGCATGGGATAATGAAATAGG  
ACTCTGGTGCTATTTTGTGGTTTCTAACACCGGAGTAATGGTCAACAGGGACAGTCAGG  
GGCACTCGTATTCCGCCGAGAGAGGTGAAATTCTCAGACCAGCGTAAGACGAACCACTG  
CGAAAGCATTGTCAGGGATGTTTTCACTGATC

**Séquence 2 : amplifiat PRYM03+3/HaptoRI (Prym454)**

CGAAACCAACAAAATAGCACCAGAGTCCTATTTTCATTATCCCATGCTAATCCATGCAAGA  
GCGAGCTGCCTGCTTCAAACACTCTGATTTTTTCAAAGTAAACGATCCGTCTCCCGCACCC  
GCTCAGCTAAGAGGAGGCGCGGTCTCCGGAAGAAAGGACGACTCCGCCAGTGCATACCC  
AACGGCAGACCGGCGCAACCGACCCGAAATCCGACTACGAGCGTTTTAACTGCAACAAC  
TTTAATATACGCTATTGGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAGACTTGCCCTCCA  
ATTGATCCTCGTGAAGAGATGTAAATTGTACTCATTCCAATAAGACCAAGATGGCCC  
TGTATTGTTATTTCTTGTCACTACCTCCCTGTGTCAGGATTCGGGCAATTTAC

**Séquence 3 : amplifiat Lhapto\_/Lhapto20R\_bis (LSU1)**

GGTATCGGAGAAGGTGAGAATCCTGTGCCGTGGCGCGTGGCGGCCTCACGATGCGTCCTT  
GTCGAGTCGGGTTGCTTGGGATTGCAGCTTGAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTA  
AATAGTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGCAAAGAACTTT  
GAAAAGAGAGTCAAAGAGTGCTTCAAATTGGCAGGAGGAAACCCGGTTGCGCCCGGCGT  
CGGCGCGTCTGACTCAGCCGCGTGCCTGCTCGTCCCTGTGCGGACCGCAAGGCCGCTTTGGG  
TTTGGTGTGTGTCGGTGCCTTTGACGCGCCGGTTCAGCTTTCGCTGCGTGCTTCGTGAG  
ATGCCGTAGGGTGAGGCCTTGTGCGATCCATTTCGGAGCGTCGCGGCCGCGGCGGATGTT  
TAGTTGAGCTGACGGAACGGGCGCCACCGACCCGTCTAGAAACACGGACCAAGGAGTCT  
GA

**Figure 54** : Séquences d'ADN des produits PCR obtenus avec les couples d'amorces Hap454, Prym454 et LSU1.

L'introduction d'une séquence à identifier dans BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) permet de retrouver rapidement celles ayant des zones de similitudes avec la séquence entrée, et de réaliser des alignements avec ces régions homologues. Les séquences d'ADN issus de l'amplification avec les couples d'amorces Hap454 et Prym454 ont montré des homologies avec les séquences des souches *Chrysotila stipitata*, *Pleurochrysis carterae* et *Pleurochrysis scherffellii* (98 et 99 % de similarité, pour respectivement). La séquence d'ADN de LSU1 a montré des homologies avec les séquences des souches *Chrysotila stipitata* et *Pleurochrysis carterae* (99 % de similarité) (**Tableau 21**).

**Tableau 21** : Pourcentages de similarités et de couverture des séquences des produits PCR des couples d'amorces Hap454, Prym454 et LSU1.

Locus	Couples d'amorces	Spécificités	Espèces possibles	Similarités de séquence (%)	Couvertures de séquence (%)
18S (SSU)	Hap454	Haptophyta	<i>Chrysotila stipitata</i> , <i>Pleurochrysis carterae</i> ,	98	100
	Prym454	Prymnesiophyceae	<i>Pleurochrysis scherffellii</i>	99	100
28S (LSU1)	LSU1	Haptophyta	<i>Chrysotila stipitata</i> , <i>Pleurochrysis carterae</i>	99	100

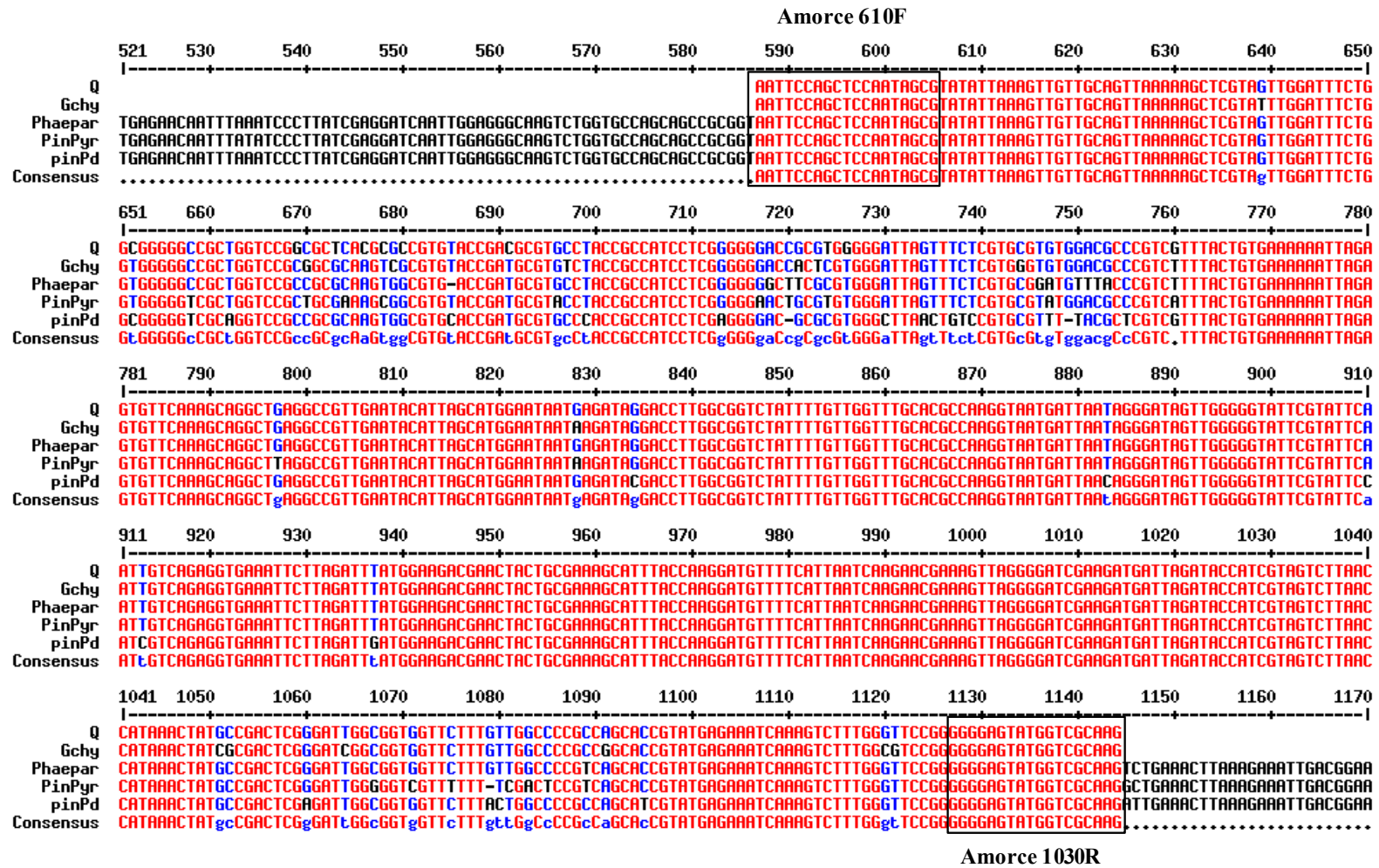
La comparaison des séquences d'ADN codant pour l'ARNr 18S et 28S extraites de la microalgue RCC4633 avec celles des bases de données NCBI a donc permis son identification comme étant une microalgue Haptophyta appartenant au genre *Chrysotila*. En 2014, les genres *Pleurochrysis* et *Chrysotila* ont été fusionnés. Le nom de genre *Chrysotila* présentant une antériorité, les souches appartenant au genre *Pleurochrysis* ont été rebaptisées *Chrysotila* (par exemple l'espèce *Pleurochrysis dentata* s'appelle maintenant *Chrysotila dentata*) (**Andersen et al., 2014**). En revanche, les pourcentages des similarités de séquences (98 et 99 %) ne permettent pas de déterminer précisément l'espèce de la souche RCC 4633.

## 4.2 Souches RCC3688 et RCC3707

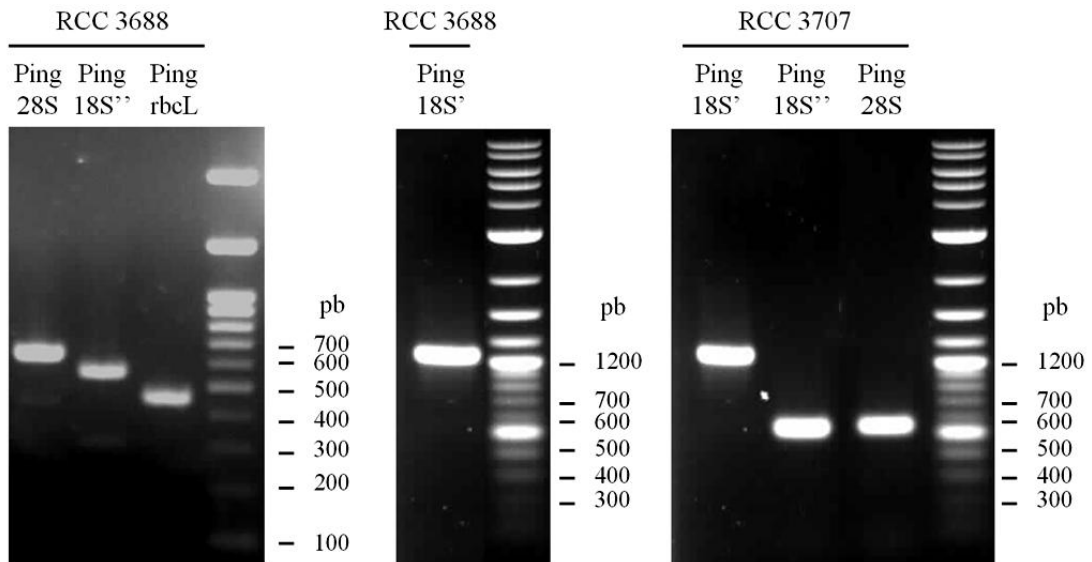
Les microalgues RCC3688 et RCC3707 sont référencées sous le genre *Glossomastix* au niveau de la RCC. Ces souches ont été confirmées comme productrices d'EPS lors du criblage et du fait des compositions polysaccharidiques différentes lors des productions en PBR et bouteilles airlift, des investigations taxonomiques se sont révélées nécessaires. Les souches ont donc été soumises à une extraction d'ADN total. Les gènes codant pour l'ARNr 18S (Ping18S' et Ping18S''), 28S (Ping28S) et la rbcL (grande sous-unité dite « L » de la RuBisCo - PingrbcL) des deux ADN extraits ont été amplifiés par PCR (partie II.2.1). Ces analyses ont été réalisées à partir des cultures en erlenmeyer.

Les amorces ont été réalisées à partir de multiples alignements de séquences de souches appartenant à la classe des Pinguiphyceae. La **Figure 55** montre les alignements multiples ayant permis la construction du couple d'amorces Ping18S'' (610F+1030R). Les amorces ont été positionnées de part et d'autre des régions présentant des différences de nucléotides afin de discriminer les espèces les unes par rapport aux autres. Ces différences permettront peut-être d'identifier une éventuelle différence d'espèce des souches RCC3688 et RCC3707.

Les tailles des produits de PCR déterminées après migration sur gel d'agarose correspondent à celles attendues pour les deux souches, excepté celle du couple d'amorce Ping18S' dont la taille est proche de 1200 pb (au lieu des 600 pb estimés) (**Figure 56**). L'analyse de la séquence de l'amplifiat a révélé la présence d'un intron d'environ 650 pb, ce qui permet d'expliquer la taille du fragment de 1200 pb obtenue lors de la migration sur gel. Les fragments générés avec les couples d'amorces Ping28S, Ping18S'' et PingrbcL font environ 600, 600 et 500 pb, respectivement (donnée non présentée pour le fragment issu de l'amplification de l'ADN de la souche RCC3707 avec le couple PingrbcL). Les séquences des produits de PCR sont visibles au niveau des **Figures 57 et 58**.



**Figure 55** : Alignements multiples de séquences de Pinguiphyceae ayant permis le design du couple d’amorces 610F+1030R (Ping18S’').  
**Rouge** : les nucléotides sont identiques entre les séquences, **Bleu** : correspond à une différence de nucléotide entre les séquences, **Noir** : les nucléotides ne correspondant pas aux nucléotides de la séquence consensus.



**Figure 56** : Migration sur gel d'agarose des produits PCR obtenus à partir des couples d'amorces Ping18S', Ping18S'', Ping28S et PingrbcL et des ADN totaux des souches RCC3688 et RCC3707.

Les séquences d'ADN issus d'un même couple d'amorce ont été alignées deux à deux. Pour la séquence du 18S', l'alignement a été effectué après avoir écarté l'intron. La **Figure 59** présente à titre d'exemple les résultats des alignements de séquences pour les produits PCR obtenus avec les couples d'amorces Ping18S'' et PingrbcL. L'ensemble des résultats montrent que les séquences d'ADN sont identiques et ce pour plusieurs marqueurs (Ping18S', Ping18S'', Ping28S et PingrbcL), ce qui démontre que les deux souches sont identiques. Comme précédemment, un BLASTn a été réalisé afin de trouver des homologies de séquences entre les produits PCR et les données de NCBI. Tous les produits PCR ont montré des homologies avec la souche *Glossomastix chrysoplata* (**Tableau 22**).



**RCC3707 - Séquence 1 : amplifié 91F+610R (Ping18S') (intron en rouge)**

CTGCGAATGGCTCATTATATCAGTTATAGTTTCTTTGATATTCCCTGGCTACATGGATAAC  
CGTAGTAATTCTAGAGCTAATACATGCATGATTCCCAACTGCTTGTTCGGAAGGGATGTAT  
CTATTAGATGGAACCAATGCGGCCTCGGCCGGTTTTGTGGTGAATCATAATATCTTCAC  
GAATCGCAGCTTGCTGCGATGGATCATTCAAGTTTCTGCCCTATCAGCTTTGGATGGTAGG  
GTATTGGCCTACCATGGCGGTAACGGGTAACGGAGAATTGGGGTTCGATTCCGGAGAGG  
GAGCCTGAAAGCTTGTCTGCGCCGCGGGGGGCTGTGGTAGCACCCCTGCGGCGAGAGACAC  
CCTCGGTGTGCGCGAGGCCATCTGGCGCCATAACCACTTGGGCAAGTCGCACGGAGAAGGT  
GCGGCTAGTGGCTGGGGCTGGCCGTGGCGCGCGCGGGTGGCAAGGCCACGGCGTTCC  
GCGCGTGTGGGAGCTCCGGTTGCAACACCGTCAAATTGCGGGGACGCCCTAAAGCTCGT  
TGTACCAACCCGCGCTGGAAACGGTGGCGGGGGCCGGGGTAATGACCTAGGGTACGGTA  
ACAACCAACGAGATGCGACAATGGGTGATCCGCAGCCAAGCTCTACGGGCGCTCAGGCG  
CCTAGGAGTGCAGTTCACAGACTAAATGGTGGTGGGCTGGGGTGGGTCCCGCGGCTACAC  
GGCGCGGGGACCGGCCCTGGCTTAAGATATAGTCGGCCCCCGGGCGAAAGCTCGGCCGG  
CGAGAGGATCTGCCCGGCAACGCGGGGAGGGAGAGCTCGTCGGGGGGAGGGGGGAGAC  
GCGGTTTTGTCTGGGCCGCGTGAAGGCGGTGCGCTCGGCCCGGCCCCCCCTTTCTGGAATC  
GCGGAGAGACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCCTG  
ACGAAGGGAGGTAGTGACGATAAATAACAATGTACGGACTTTTACAAGTCGCGTCATCTG  
GAATGAGAACAATTTAAATCCCTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGC  
AGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGC

**RCC3707 - Séquence 2 : amplifié 610F+1030R (Ping18S'')**

CCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTG  
GCGGGGGCCGCTGGTCCGGCGCTCACGCGCCGTGTACCGACGCGTGCCTACCGCCATCCT  
CGGGGGGACCGCGTGGGGGATTAGTTTCTCGTGCCTGTGGACGCCCGTCTTTACTGTGA  
AAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCTGAGGCCGTTGAATACATTAGCATGGAATAATGA  
GATAGGACCTTGGCGGTCTATTTTGTGGTTTGCACGCCAAGGTAATGATTAATAGGGAT  
AGTTGGGGGTATTCGTATTCAATTGTCAGAGGTGAAATTCTTAGATTTATGGAAGACGAA  
CTACTGCGAAAGCATTACCAAGGATGTTTTATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATC  
GAAGATGATTAGATACCATCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTCGGGATTGGCGG  
TGGTTCTTTGTTGGCCCCGCCAGCACCGTATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCGGGGG  
GAGTATGGTCGCAAG

**RCC3707 - Séquence 3 : amplifié 450F+890R (PingrbcL)**

CCGTGGTTCTTTTGACGGGCATATGTTGAGTTACCCGCACGGTGCAGGTGAAGAATCATG  
TCATTTTTACGAGACCAGATAGCCATAGACTGGATTGCTGTGTAACCAATCACAAGGTCA  
ATCATAATAAATTTGTACCTACGCTTTTAGCATATTCAGCACGTTTCATACATTTCTTCCA  
TGGTAGCTGCTGTAGTGTCAAGTATGAACCTTTAACTTCGCCGGATGCAGCTGCAGATC  
GGTTAACACCCTCCATCACATATAAGAAACGCTCTCTCCAACGCATAAATGGTTGAGAGT  
TGATGTTCTCATCATCTTTACAGGAAGTCTAAACCACCACGTAAACCCTCGTATACTACAG  
ACCGTAGTTTTTACCAGATAAACCTAGTTTTAGTTTTACAGTTGCACCTAAGAATGGGCG  
ACCATATTTATCCATACGCTCACGTT

**Figure 57** : Séquences d'ADN des produits PCR de la souche RCC3707 obtenus avec les couples d'amorces Ping18S', Ping18S'' et PingrbcL.

**RCC3688 - Séquence 1 : amplifiat 610F+1030R (Ping18S'')**

CTTGCGACCATACTCCCCCGGAACCCAAAGACTTTGATTTCTCATACGGTGCTGGCGGG  
GCCAACAAAGAACCACCGCCAATCCCGAGTCGGCATAGTTTATGGTTAAGACTACGATGG  
TATCTAATCATCTTCGATCCCCTAACTTTCGTTCTTGATTAATGAAAACATCCTTGGTAAA  
TGCTTTCGCAGTAGTTCGTCTTCCATAAATCTAAGAATTTACCTCTGACAATTGAATACG  
AATACCCCAACTATCCCTATTAATCATTACCTTGGCGTGCAAACCAACAAAATAGACCG  
CCAAGGTCCTATCTCATTATCCATGCTAATGTATTCAACGGCCTCAGCCTGCTTTGAACA  
CTCTAATTTTTTACAGTAAACGACGGGCGTCCACACGCACGAGAACTAATCCCCCAGC  
CGGTCCCCCGAGGATGGCGGTAGGCACGCGTCCGTACACGGCGCGTGAGCGCCGGACC  
AGCGGCCCCCGCCAGAAATCCAACACTACGAGCTTTTTAACTGCAACAACTTTAATATACGC  
TATTGGAGCTGGAATT

**RCC3688 - Séquence 2 : amplifiat 1260F+610R (Ping28S)**

CAGAGGCTGCACACCTTGGAGACCTGATGCGGTTATGAGTACGACCAGAGGTGCCAATA  
AATCACGCCGCGGGGTTTCAAGGGCCGTCGGAAGCGCACCGGAGCGCACAAAAGCTAT  
GCGCCTTTTCCAGCGCCTGCGCCCTCTCGCCGCTCAACGCGATTCCAGGGTCCAGGCATCT  
GTTAACAAGAAAAGACAACCTTCCCGGGGCTCCCGCAGACGTGCCCGGCTTCGTTCTGTG  
TTGCCACTCGCTATCCACGTTCTGGCAGCGGAATTTAAACCGCTTCCCTTTCGGCGCGCG  
GGCGCGCAAGCGCCGCTGTCCGGACTTCTCCTGCGCCTTAGGATCGGCTCACCCATGTC  
CAATTGCTGTTACATGGAACCTTCTCCACGTCGGCCTTCAAAGTTCTCATTGGAATGTT  
TGCTACTACCACCAAGATCTGCACCAGGGCCCGTTCCACACCGGCTCACGCCGCGCGCTT  
AGCCACGAGCCCCGCGCCCTCCTACTCATGGGGGCCTACCCCTTGCCCCATGGCCGGGT  
ATAAGTCGCACGCTTCAGCGCCATCCATTTTCAGGGCTAGTTGATTTCGGCAGGTGAGTTG  
TTACACACTCCTTAGCGGGTTCGACTTCCATGGCCACCGTC

**RCC3688 - Séquence 3 : amplifiat 450F+890R (PingrbcL)**

AACGTGAGCGTATGGATAAATATGGTCGCCATTCTTAGGTGCAACTGTAAAACCTAAAC  
TAGGTTTATCTGGTAAAAACTACGGTCGTGTAGTATACGAGGGTTTACGTGGTGGTTT  
ACTTCCTGAAAGATGATGAGAACATCAACTCTCAACCATTTATGCGTTGGAGAGAGCGTT  
TCTTATATGTGATGGAGGGTGTAAACCGATCTGCAGCTGCATCCGGCGAAGTTAAAGGTT  
CATACTTGAACACTACAGCAGCTACCATGGAAGAAATGTATGAACGTGCTGAATATGCTA  
AAAGCGTAGGTACAATTATTATTATGATTGACCTTGTGATTGGTTACACAGCAATCCAGT  
CTATGGCTATCTGGTCTCGTAAAAATGACATGATTCTTACCTGCACCGTGCGGGTAACCT  
AACATATGCCCGTCAAAGAACCACGGTATTA

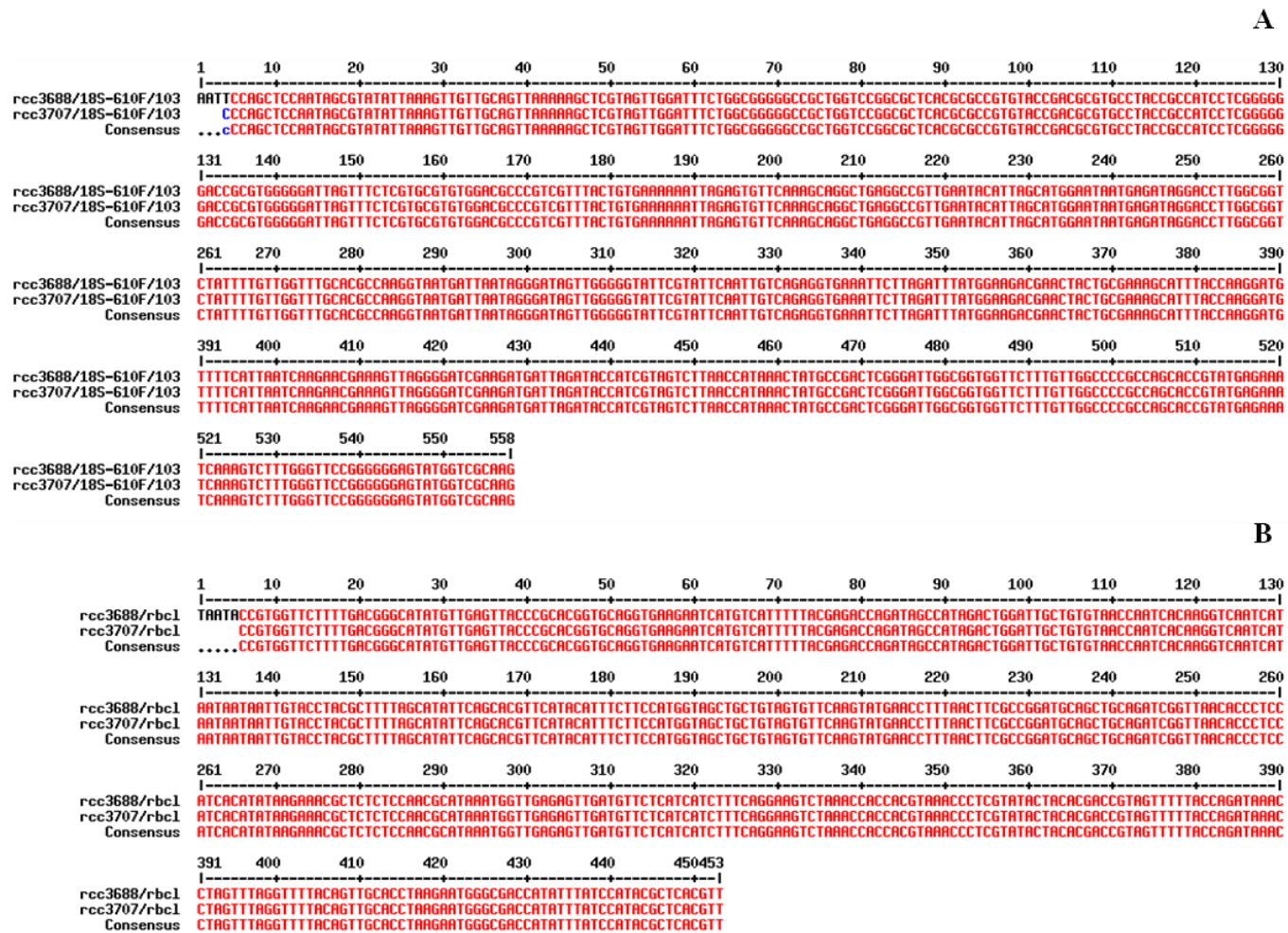
**Figure 58 :** Séquences d'ADN des produits PCR de la souche RCC3688 obtenus avec les couples d'amorces Ping18S'', Ping28S et PingrbcL.

Ces résultats confirment que les souches RCC3688 et RCC3707 appartiennent au genre *Glossomastix*. Cependant, les pourcentages de similarités des séquences des produits de PCR avec celles de la souche *Glossomastix chrysoplata* sont trop faibles pour affirmer que ces souches soit de l'espèce *chrysoplata* (96 et 98 % pour les couples d'amorces Ping18S', Ping28S et Ping18S'', et 88 % pour le couple d'amorces PingrbcL). A l'heure actuelle, seule cette espèce est référencée dans Algaebase et les diverses banques de souches, incluant la RCC. Ces résultats suggèrent que les souches *Glossomastix* RCC3688 et RCC3707 appartiennent à une nouvelle espèce.

Pour conclure, ces résultats privilégient davantage les hypothèses de i) l'impact d'un ou plusieurs paramètres opératoires sur le changement de composition en monosaccharides de l'EPS de *Glossomastix* RCC3688, et ii) une contamination par une autre souche au cours de la culture, qui aurait été responsable de la production du potentiel galactoxylane.

**Tableau 22** : Pourcentages de similarités et de couverture des séquences des produits PCR des couples d'amorces Ping18S', Ping18S'', Ping28S et PingrbcL.

Locus	Couples d'amorces	Spécificité	Espèces possibles	Similarités de séquence (%)	Couvertures de séquence (%)
18S	Ping18S'	Pinguiophyceae	<i>Phaeomonas parva</i> , <i>Glossomastix chrysoplata</i>	96	100
	Ping18S''	Pinguiophyceae	<i>Glossomastix chrysoplata</i>	98	100
28S	Ping28S	Pinguiophyceae	<i>Glossomastix chrysoplata</i>	96	100
rbcL	PingrbcL	Pinguiophyceae	<i>Glossomastix chrysoplata</i>	88	100



**Figure 59** : Alignements des séquences d'ADN des produits de PCR des souches RCC3688 et RCC3707 obtenus avec les couples d'amorces (A) Ping18S'' et (B) PingrbcL. **Rouge** : les nucléotides sont identiques entre les séquences, **Bleu** : correspond à une différence de nucléotide entre les séquences, **Noir** : les nucléotides ne correspondent pas aux nucléotides de la séquence consensus.

## 5. Etude des propriétés physico-chimiques des EPS

### 5.1 Caractérisations physico-chimiques en régime dilué

Les analyses ont été réalisées par le laboratoire Polymère, Biopolymères, Surface (PBS), UMR 6270 de l'Université de Rouen. Les caractéristiques physico-chimiques des EPS ont été déterminées en régime dilué en utilisant la Chromatographie d'Exclusion Stérique (CES) couplée à la Diffusion de la Lumière Multi-Angles (DLMA, ou MALS pour Multi-Angle Laser Light Scattering) et à la réfractométrie différentielle (partie II.9.1). La CES permet de séparer les macromolécules en fonction de leur volume hydrodynamique en solution. Plus la macromolécule est de faible masse molaire, plus le temps d'élution sera long. La DLMA et la réfractométrie différentielle (differential Refractive Index: dRI) permettent d'accéder aux masses molaires moyennes en nombre ( $M_n$ ) et en masse ( $M_w$ ) et renseignent également sur l'indice de polydispersité ( $I_p$ ), le rayon de giration ( $R_g$ ) et le rayon hydrodynamique ( $R_h$ ) du polymère. Pour les analyses, les EPS ont été solubilisés à une concentration de  $0,3 \text{ g.L}^{-1}$  dans une solution de  $\text{LiNO}_3$  1 M additionnée de 0,05 % de  $\text{NaN}_3$  pendant 1 semaine à  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ . Cinq cent  $\mu\text{L}$  d'échantillon ont ensuite été injectés après filtration sur  $0,5 \mu\text{m}$ . Les macromolécules éluées sont soumises à un rayonnement incident qui diffuse selon différentes directions en fonction de leur taille et de leur conformation et sont analysées par réfractométrie différentielle ( $dn/dc$  égal à  $0,147 \text{ mL.g}^{-1}$ ). Le **Tableau 23** présente les résultats obtenus à partir des chromatogrammes pour PSCN (*Chrysotila dentata*), PSPN (*Pavlova*), PSDN (*Diacronema*) et PSSN (*Synechococcus*) (**Figures 60**).

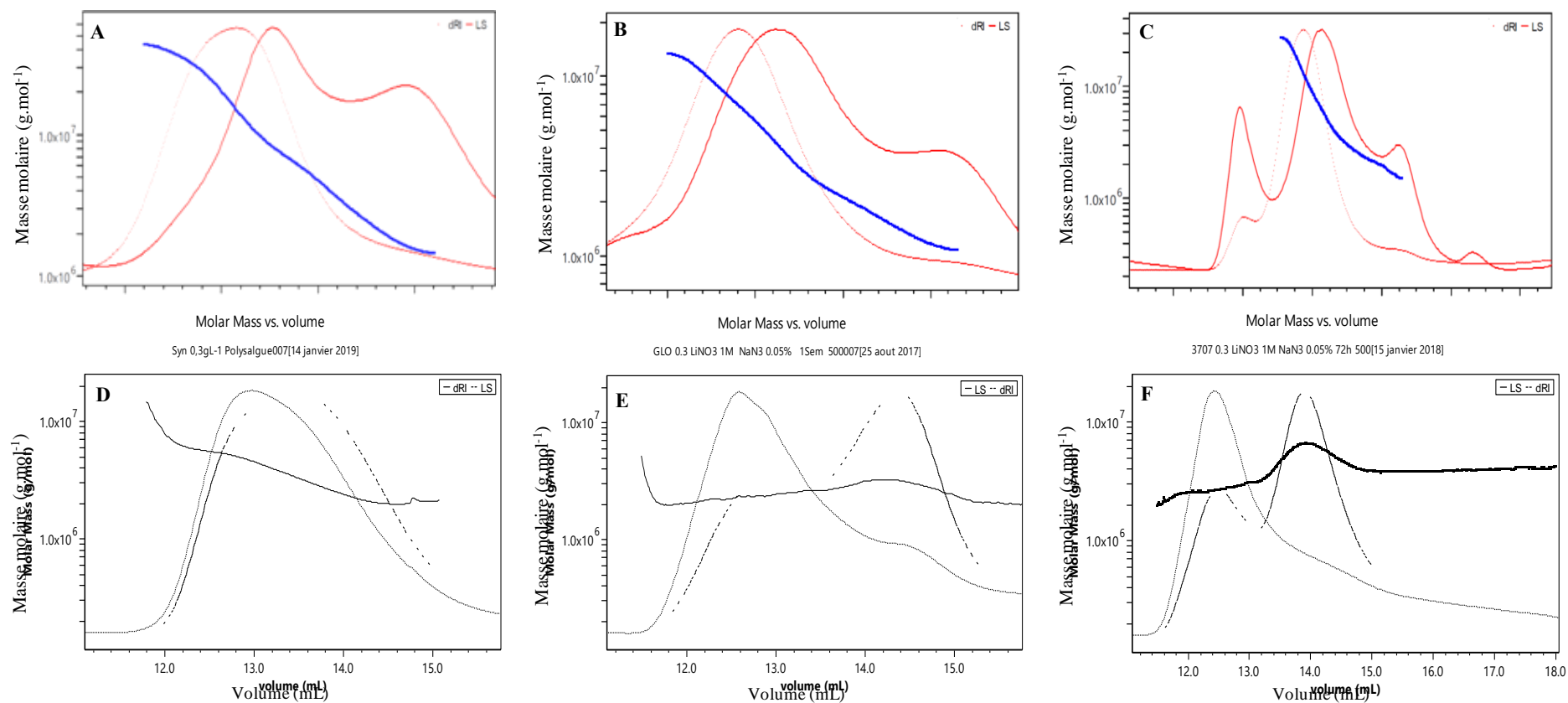
**Tableau 23** : Caractéristiques physico-chimiques des EPS déterminées à partir des analyses en CES-DLMA-dRI.

	Matière récupérée entre 11 et 19 mL (%)	Fraction séparée entre 13,2 et 16 mL					
		%	Mn (g.mol <sup>-1</sup> )	Mw (g.mol <sup>-1</sup> )	Ip	Rg (nm)	Rh (nm)
<b>PSCN</b>	68	46	4 320 000	9 500 000	2,2	53	47

	Matière récupérée entre 11 et 19 mL (%)	Fraction séparée entre 13 et 16,3 mL					
		%	Mn (g.mol <sup>-1</sup> )	Mw (g.mol <sup>-1</sup> )	Ip	Rg (nm)	Rh (nm)
<b>PSPN</b>	28	22	2 590 000	4 270 000	1,6	59	75

	Matière récupérée entre 11 et 19 mL (%)	Fraction séparée entre 13 et 16,6 mL					
		%	Mn (g.mol <sup>-1</sup> )	Mw (g.mol <sup>-1</sup> )	Ip	Rg (nm)	Rh (nm)
<b>PSDN</b>	48	32	3 650 000	6 800 000	1,9	68	83

	Matière récupérée entre 11 et 19 mL (%)	Fraction séparée entre 11,8 et 15,2 mL					
		%	Mn (g.mol <sup>-1</sup> )	Mw (g.mol <sup>-1</sup> )	Ip	Rg (nm)	Rh (nm)
<b>PSSN</b>	60	50	3 100 000	3 500 000	1,1	80	73



**Figure 60 :** Chromatogramme des distributions des masses molaires en fonction du volume d'élution de (A) PSCN, (B) PSPN, (C) PSDN, (D) PSSN, (E) PSGN1 et (F) PSGN2. (● et ●) : signal dRI, (et --) : signal de diffusion de la lumière (LS), (● et ...) : zone d'intégration pour la détermination des valeurs de  $M_n$ ,  $M_w$ ,  $I_p$ ,  $R_g$  et  $R_h$ .

Les différents EPS sont caractérisés par des valeurs de  $M_n$  comprises entre  $2,6 \times 10^6$  et  $3,7 \times 10^6$  g.mol<sup>-1</sup> (fractions PSPN et PSDN, respectivement) et des valeurs de  $M_w$  comprises entre  $3,5 \times 10^6$  et  $9,5 \times 10^6$  g.mol<sup>-1</sup> (fractions PSSN et PSCN, respectivement). Les valeurs ne représentent que 22, 32, 46 et 50 % des échantillons PSPN, PSDN, PSCN et PSSN, respectivement, avant filtration. Elles ne sont donc pas totalement représentatives des polymères natifs.

Les indices de polydispersité ( $I_p$ ) des EPS sont extrêmement variables d'un polymère à l'autre. En effet, ces derniers varient entre 1,1 pour PSSN et le double pour PSCN. La faible polydispersité de la fraction PSSN ( $M_w/M_n = 1,1$ ) est synonyme d'une gamme étroite de distribution de masse et confirme la présence d'un polysaccharide homogène. En revanche, les polydispersités des fractions PSPN, PSDN et PSCN sont plus importantes (1,6, 1,9 et 2,2, respectivement) suggérant des fractions polydisperses.

Les  $R_g$  compris entre 53 et 80 nm pour des masses molaires élevées ( $M_w > 3\,500\,000$  g.mol<sup>-1</sup>) indiquent que les polymères adoptent une conformation compacte dans l'eau, mais à des niveaux variables. En effet, la fraction PSCN dont la masse molaire est la plus élevée ( $9,5 \times 10^6$  g.mol<sup>-1</sup>) possède les plus petits  $R_g$  et  $R_h$ , ce qui signifie que la molécule occupe très peu d'espace dans la solution. A l'inverse, la fraction PSSN dont la masse molaire est la plus faible ( $3,5 \times 10^6$  g.mol<sup>-1</sup>) possède des  $R_g$  et  $R_h$  élevés (80 et 73, respectivement). PSSN adopte donc une conformation moins compacte dans l'eau par rapport à PSCN.

Concernant PSGN1 et PSGN2, aucun résultat n'a été obtenu faute de séparation. En effet, les EPS ont été solubilisés efficacement dans la solution aqueuse de LiNO<sub>3</sub> 1 M mais la grande partie de l'échantillon est retenue dans le filtre avant injection et la faible quantité éluee n'a pu être séparée efficacement. Ainsi, ils ne peuvent pas être valablement caractérisés à l'état natif par couplage CES-DLMA-dRI.

## **5.2 Caractérisations rhéologiques en régime semi-dilué**

### **5.2.1 Mesures en écoulements**

Des mesures de rhéologie en écoulements, ont été menées par le laboratoire PBS sur PSGN1 et PSGN2 (*Glossomastix* (RCC3688) et (RCC3707), respectivement) (partie II.9.2). Ces études ont été réalisées uniquement sur ces deux polymères car leur mise en application nécessitait environ 3 g de produit, quantité disponible que pour ces deux polymères. La



Figure 61 présente les courbes d'écoulement de PSGN1 et PSGN2 à différentes concentrations.

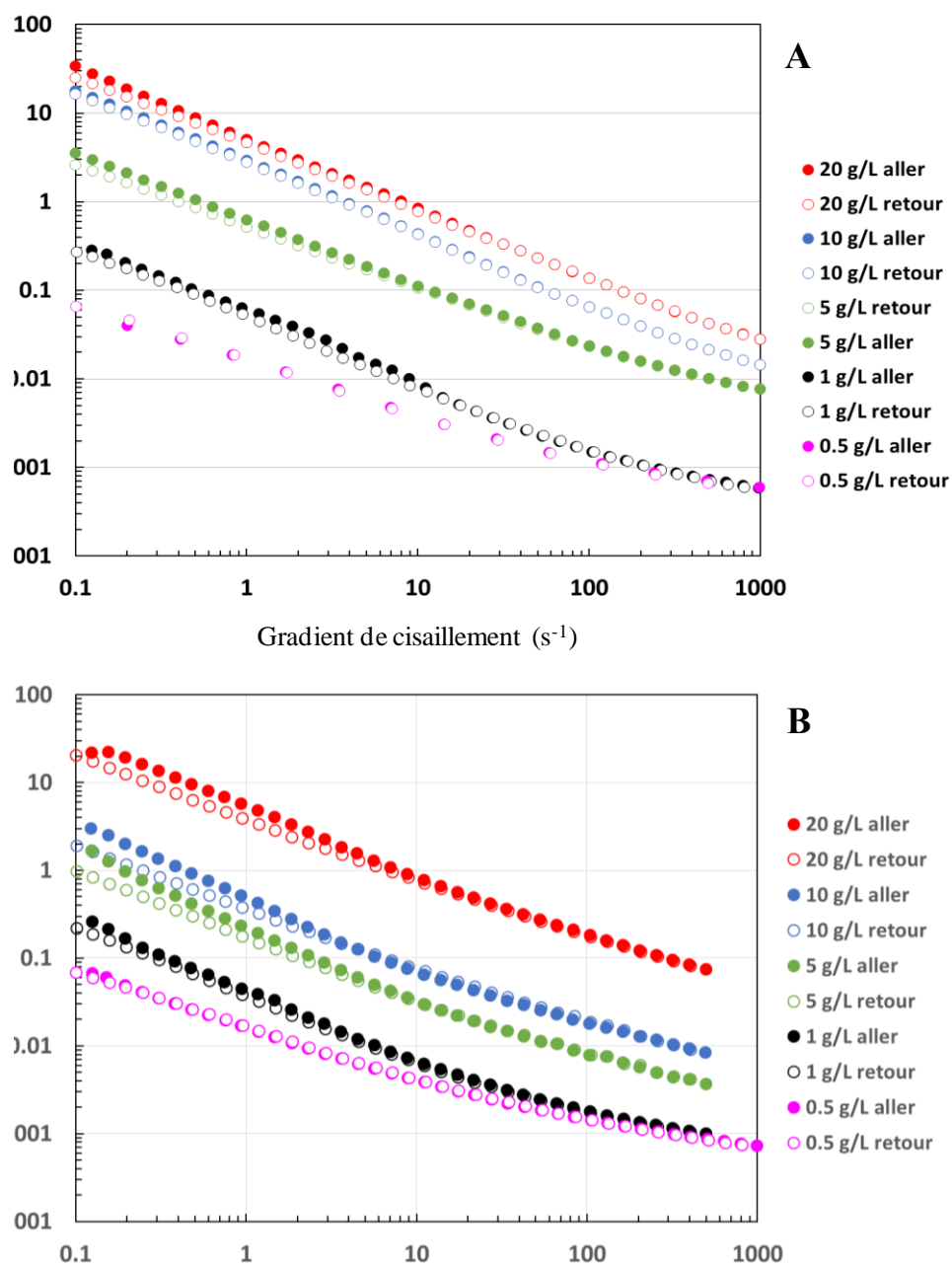
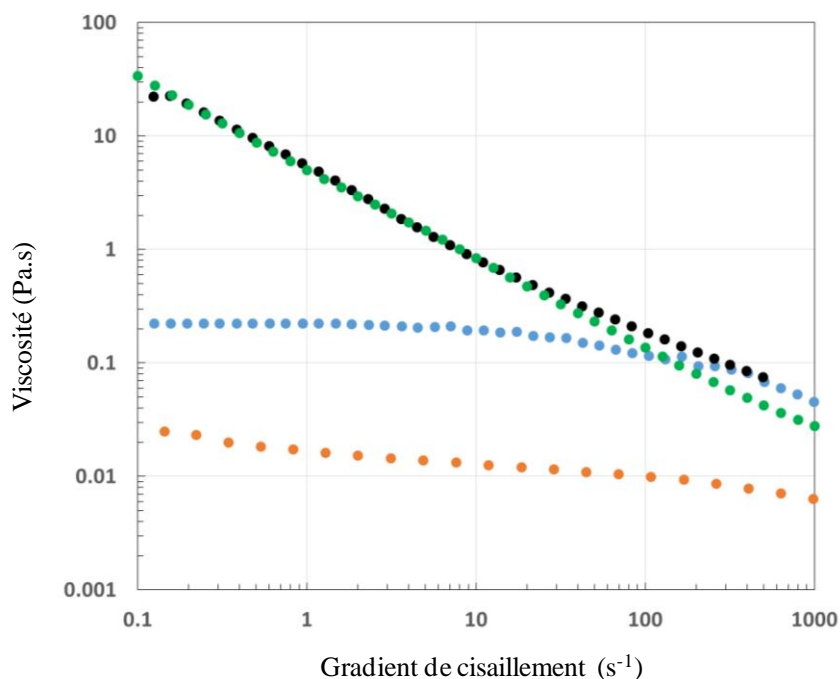


Figure 61 : Evolution de la viscosité apparente (Pa.s) de solutions aqueuses additionnées de 200 ppm de  $\text{NaN}_3$  de (A) PSGN1 et (B) PSGN2 en fonction du gradient de cisaillement ( $\text{s}^{-1}$ ) à 0,5, 1, 5, 10 et 20  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  et à 25 °C.

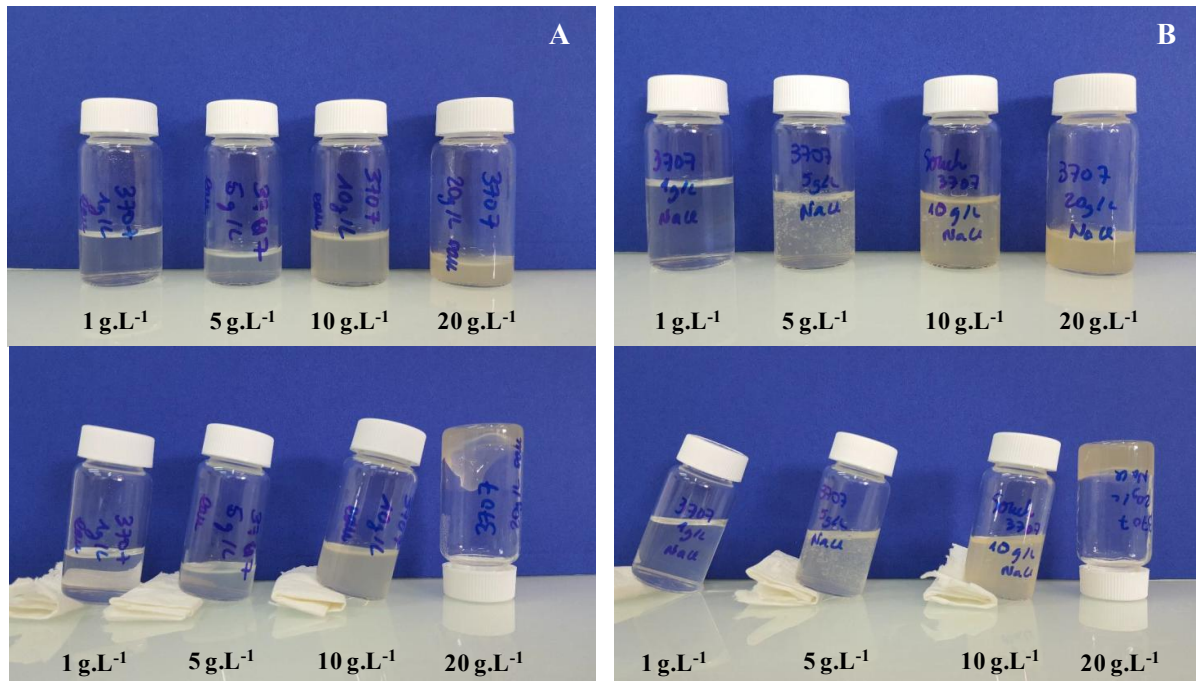
Les polymères présentent des comportements en solution très similaires. Pour toutes les concentrations, la viscosité apparente des polymères diminue lorsque la contrainte de cisaillement augmente, correspondant à un comportement de type rhéofluidifiant. De plus, ces polymères présentent une très faible thixotropie. Ce comportement rhéologique a été comparé à celui de PSPN et d'un alginate commercial. Le résultat est présenté **Figure 62**.



**Figure 62** : Variation de la viscosité apparente (Pa.s) de solutions aqueuses de (●) PSGN1, (●) PSGN2, (●) PSPN et (●) alginat à 20 g.L<sup>-1</sup> additionnées de 200 ppm de NaN<sub>3</sub> en fonction du gradient de cisaillement (s<sup>-1</sup>) à 25 °C.

Malgré une viscosité différente pour une même concentration (20 g.L<sup>-1</sup>), PSPN présente un comportement en solution similaire de celui de l'alginat (comportement Newtonien aux faibles gradients de cisaillement puis légèrement rhéofluidifiant). Ce comportement est complètement différent de celui de PSGN1 et PSGN2 qui montrent de très fortes viscosités en solution. Par ailleurs, cette viscosité semble être plus importante lorsque les polymères sont solubilisés dans une solution de NaCl 0,15 M (**Figure 63**). A 20 g.L<sup>-1</sup> et en absence de NaCl, les solutions de PSGN2 s'écoulent beaucoup plus « rapidement » que celles additionnées de ce sel à 0,15 M. Cette viscosité accrue en présence de NaCl est cohérente avec les problèmes rencontrés lors des analyses en CES-DLMA-dRI. En effet, une très forte viscosité est souvent associée à un comportement très associatif des molécules en solution, formant ainsi des macros structures qui ne peuvent être efficacement séparées. A

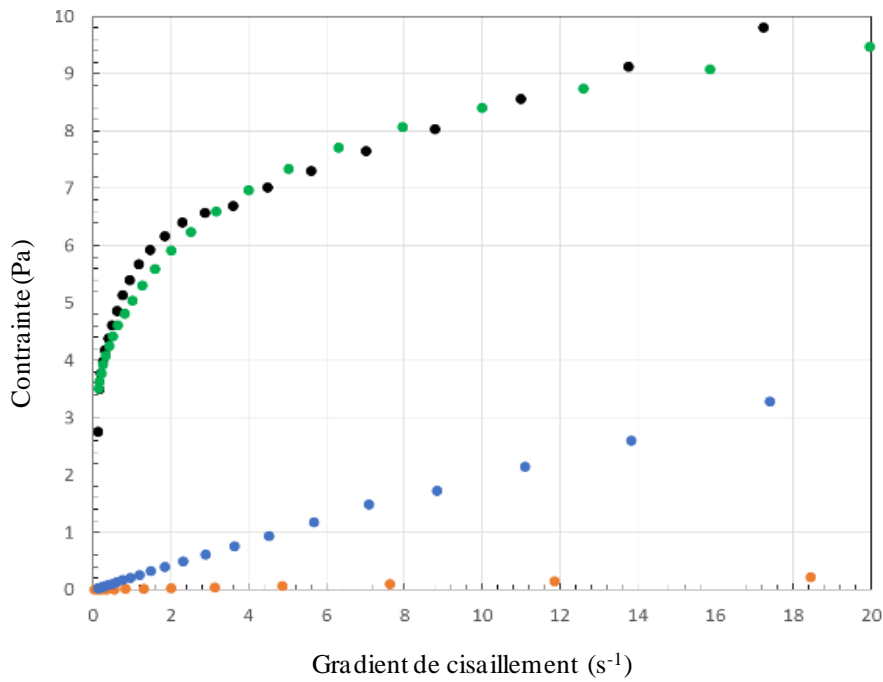
l'inverse, PSPN peut être plus efficacement analysé du fait d'une viscosité plus faible en solution. Cependant, seulement 28 % de la matière avait été récupérée entre 11 et 19 mL d'élution, et seulement 22 % de la fraction avait pu être caractérisée en CES-DLMA-dRI (Tableau 23).



**Figure 63** : PSGN2 solubilisé à 1, 5, 10 et 20 g.L<sup>-1</sup> avec addition de 200 ppm de NaN<sub>3</sub> dans (A) l'eau et (B) NaCl 0,15 M.

La **Figure 64** montre que les solutions aqueuses de PSGN1 et PSGN2 sont du type fluides à contraintes de seuil, encore appelés fluides pseudoplastiques, d'après la modélisation Hershel-Bulkley (*e.g.* gels pour cheveux, crèmes cosmétiques, mousses à raser, ketchup, mayonnaise). Ce type de fluide ne commence à s'écouler qu'au-delà d'une certaine contrainte appelée « contrainte seuil » correspondant respectivement à 3,4 et 1,5 Pa pour le PSGN2 et PSGN1. Ce seuil de contrainte n'existe pas pour PSPN et l'alginate commercial.

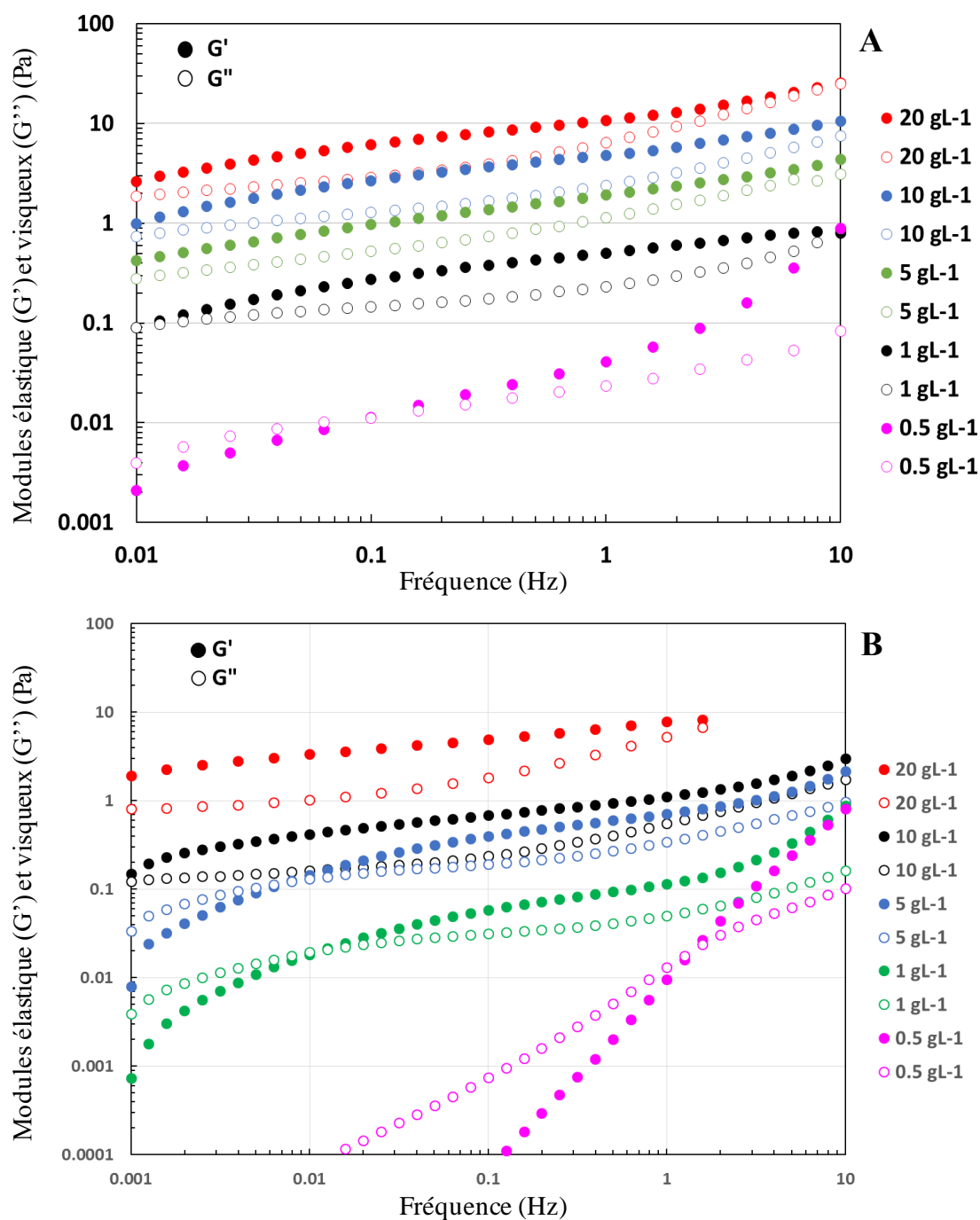
$$\sigma = \sigma_0 + K\dot{\gamma}^n \quad \text{Modèle de Hershel-Bulkley}$$



**Figure 64** : Evolution de la contrainte (Pa) à 25 °C sur des solutions aqueuses de (●) PSGN1, (●) PSGN2, (●) PSPN et (●) alginate à 20 g.L<sup>-1</sup> en fonction du gradient de cisaillement (s<sup>-1</sup>).

### 5.2.2 Mesures en Oscillations

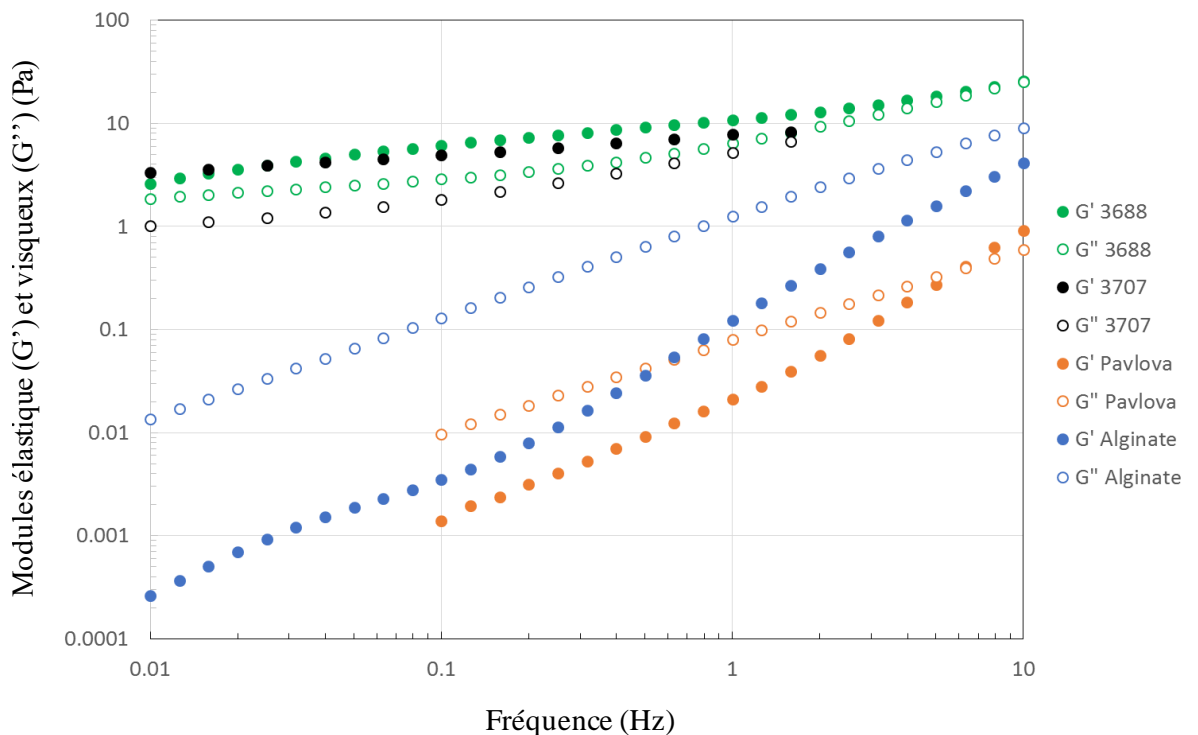
Des analyses en mode oscillatoire ont été réalisées sur des solutions de PSG1 et PSGN2 à 0,5, 1, 5, 10 et 20 g.L<sup>-1</sup> dans l'eau additionnée de 200 ppm de NaN<sub>3</sub> afin d'étudier leur viscoélasticité. Les mesures viscoélastiques dynamiques ont permis de caractériser le comportement viscoélastique des solutions de PSGN1 et PSGN2 en mesurant les modules de conservation (ou module élastique) G' (Pa) et de perte (ou module visqueux) G'' (Pa). Les résultats des mesures des variations des modules viscoélastiques G' et G'' en fonction de la déformation pour des fréquences angulaire de 0,001 à 10 Hz (ou de la pulsation) sont présentées dans la **Figure 65**.



**Figure 65** : Représentation des modules élastique  $G'$  et visqueux  $G''$  (Pa) en fonction de la fréquence (Hz) des solutions aqueuses de (A) PSGN1 et (B) PSGN2 à 0,5, 1, 5, 10 et 20  $\text{g.L}^{-1}$  additionnées de 200 ppm de  $\text{NaN}_3$ . Symboles pleins :  $G'$ . Symboles vides :  $G''$ .

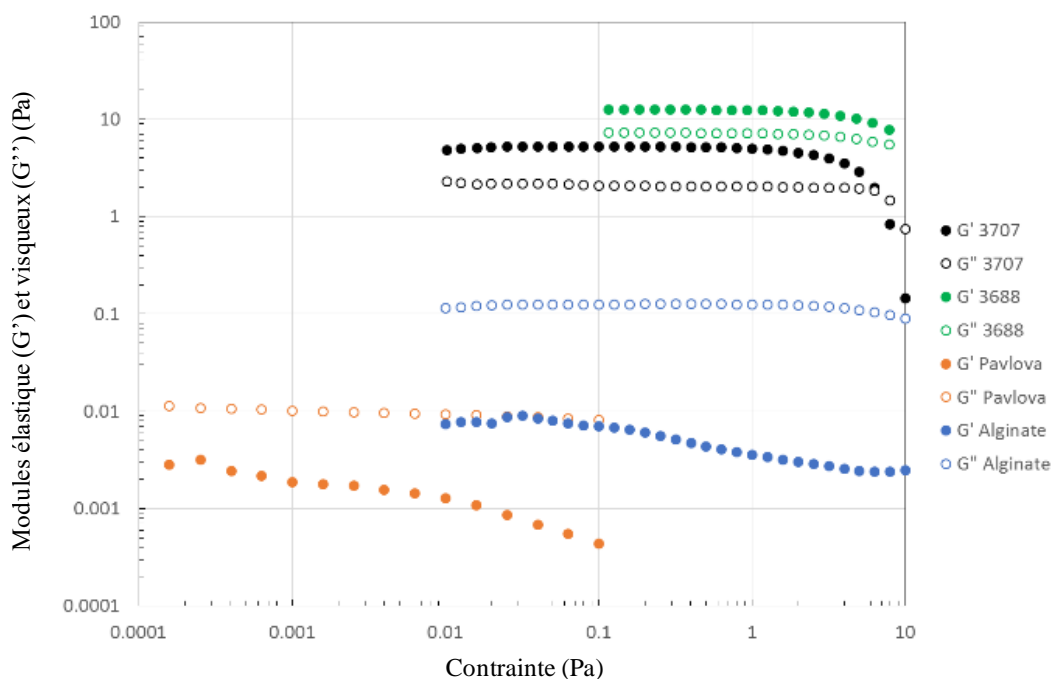
Pour les solutions de PSGN1 à 5, 10 et 20  $\text{g.L}^{-1}$ , les valeurs de  $G'$  sont supérieures à celles de  $G''$  sur tout le domaine des fréquences (0,01 à 10 Hz). Cela traduit un comportement typique de type gel fluide. Les mêmes observations peuvent être faites concernant les solutions de PSGN2 à 10 et 20  $\text{g.L}^{-1}$ . En revanche, les résultats obtenus sur les solutions de

PSGN1 (0,5 et 1 g.L<sup>-1</sup>) et PSGN2 (0,5, 1 et 5 g.L<sup>-1</sup>) montrent l'apparition d'un point de croisement entre les courbes de G' et G''. Ainsi, les solutions de PSGN1 et PSGN2 à ces concentrations adoptent un comportement viscoélastique avec un temps de relaxation (inverse de la fréquence au point de croisement) de l'ordre de 10 et 100 s pour les solutions du PSGN1 (0,5 et 1 g.L<sup>-1</sup>, respectivement) et 0,8, 85 et 140 s pour les solutions du PSGN2 (0,5, 1 et 5 g.L<sup>-1</sup>, respectivement). La comparaison réalisée avec PSPN et l'alginate commercial montre encore une fois une différence de comportement en solution (**Figure 66**).



**Figure 66** : Représentation des modules élastique G' et visqueux G'' (Pa) en fonction de la fréquence (Hz) de solutions aqueuses de (●) PSGN1, (●) PSGN2, (●) PSPN et (●) Alginate à 20 g.L<sup>-1</sup> additionnées de 200 ppm de NaN<sub>3</sub>. Symboles pleins : G'. Symboles vides : G''.

Ils présentent tous deux un comportement viscoélastique classique ( $G'' > G'$ ) avec un point de croisement pour la solution du PSPN autour de 6,5 Hz correspondant à un temps de relaxation de 0,15 s. De plus, les tests de linéarité montrent une bonne corrélation entre la contrainte limite du domaine de linéarité (environ 3 Pa) et la valeur de la contrainte seuil déterminée précédemment pour la solution de PSGN2 à 20 g.L<sup>-1</sup> (3,4 Pa) (**Figure 67**). Cela n'est pas le cas pour la solution de PSGN1 puisque les valeurs de la contrainte limite du domaine de linéarité et de la contrainte seuil sont égales à 6 et 1,5 Pa, respectivement.



**Figure 67** : Evolution des modules élastique  $G'$  et visqueux  $G''$  (Pa) en fonction de la contrainte (Pa) sur des solutions aqueuses (●) PSGN1, (●) PSGN2, (●) PSPN et (●) Alginate à  $20 \text{ g.L}^{-1}$  et à  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Symboles pleins :  $G'$ . Symboles vides :  $G''$ .

Pour conclure sur ces travaux, les analyses en CESHP-MALS-dRI ont confirmé qu'il s'agissait d'EPS de haut poids moléculaires, avec parfois des indices de polydispersité élevés montrant potentiellement plusieurs populations au sein d'un même échantillon. Par ailleurs PSGN1 et PSGN2 montrent la plus forte viscosité en solution, ce qui est cohérent avec l'incompatibilité des analyses en CES-DLMA-dRI (formation d'hyperstructures). PSPN, PSGN1 et PSGN2 ont montré des comportements en solution classiques de type rhéofluidifiant. Cependant, PSGN1 et PSGN2 présentent des comportements de type gels fluides, avec des seuils de contrainte très faibles (1,5 et 3,4 Pa, respectivement) ce qui s'apparente à des gels fragiles.

## 6. Relation entre la composition en monosaccharides et l'appartenance phylogénétique des microalgues

La **Figure 68** représente la classification phylogénétique des microalgues productrices d'EPS, et les compositions en monosaccharides de ces derniers, incluant les données bibliographiques et celles des travaux présentés partie III.1.2. Une méta-analyse a été réalisée avec les compositions en monosaccharides des EPS issus de 81 microalgues afin de

déterminer si elles pouvaient varier en fonction de l'affiliation taxonomique. Globalement, les compositions issues des différentes études ont été obtenues sur des cultures en phase stationnaire. Bien qu'il y a des variations de température, salinité, milieux de culture, etc..., ainsi que des méthodes d'extraction, de purification et d'analyse différentes entre toutes ces études, ces paramètres ne sont pas connus pour influencer drastiquement les compositions monosaccharidiques des EPS. En effet, les monosaccharides majoritaires le restent malgré les différentes conditions (parties I.3.4.2.3.1 et I.3.4.2.3.2). Les taux de certains monosaccharides varient significativement d'un phyla à l'autre ( $p < 0,05$  avec les tests de Kruskal-Wallis pour le Gal, Ara, Man, Fuc, Xyl, Rib et les acides uroniques), tandis que les taux de Rha et Glc sont relativement constants d'un phyla à l'autre ( $p = 0,117$  et  $p = 0,058$ , respectivement) (**Figure 69**). Ces différences apparaissent également sur l'arbre phylogénétique présenté à la **Figure 68**.

Des différences claires entre les 3 phyla du règne des Plantae inclus dans l'analyse (Charophyta, Chlorophyta et Rhodophyta) ont été détectées. Les EPS des Charophyta ont le profil de composition le plus distinct, avec des taux de Fuc élevés par rapport aux EPS des Chlorophyta et Rhodophyta. Le Fuc était le premier ou le deuxième monosaccharide principal dans 10/16 profils, alors qu'il ne concernait que 4/23 profils des Chlorophyta et aucun chez les Rhodophyta ( $p < 0,001$  pour chaque comparaison). Les EPS des Charophyta contiennent également des niveaux beaucoup plus élevés d'acides uroniques par rapport aux deux autres phyla ( $p = 0,013$  et  $p = 0,01$  pour les comparaisons avec les Chlorophyta et Rhodophyta, respectivement). Ils peuvent représenter 28 et 29 % de la composition des EPS de *Netrium interruptum* et *Netrium oblongum*, respectivement (**Kiemle et al., 2007**). Chez *Spondylosium panduriform*, le GlcA représente 24 % de la composition totale (**Paulsen & Vieira, 1994**) et est le monosaccharide majoritaire des EPS de *Closterium* sp. et *Hyalotheca dissiliens* (**Domozych et al., 1993 ; Vieira & Paulsen, 1994**). Les EPS des Charophyta sont également caractérisés par la présence de Rib (8/16 profils). Cette observation contraste avec les profils des EPS des Chlorophyta et Rhodophyta (Rib présent dans 1/23 et 1/13 profils, respectivement). Cette caractéristique semble être spécifique des Zygnematophyceae (8/13 profils) puisque le Rib n'a pas été trouvé chez les Klebsormidiophyceae. Plus précisément, il est systématiquement présent sous la forme de traces chez les EPS des genres *Netrium*, *Cosmarium*, *Penium*, *Tetmemorus* et *Pleurotaenium* (**Kiemle et al., 2007**). Les EPS des Rhodophyta sont caractérisés par des taux élevés de Xyl ( $p = 0,005$  et  $p = 0,001$  pour les comparaisons avec les Charophyta et Chlorophyta, respectivement). Ce monosaccharide est le



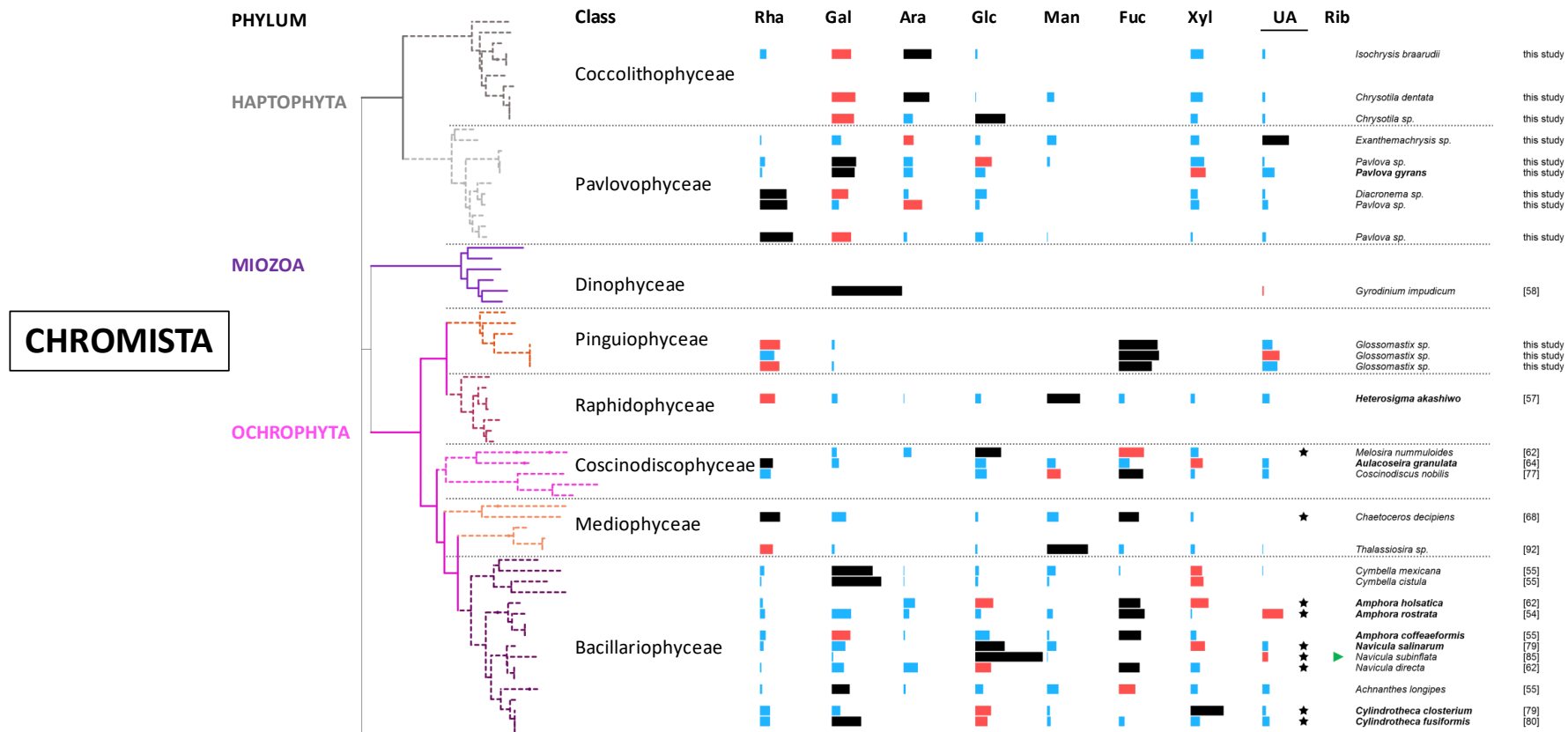
premier ou le deuxième monosaccharide principal dans 11/13 profils, ce qui contraste avec les EPS des Chlorophyta (2/23) et des Charophyta (5/16). La famille des Porphyridiaceae (incluant les genres *Porphyridium* et *Flintiella*) produit essentiellement des galactoxylanes, tandis que la famille des Glaucosphaeraceae (genre *Rhodella*) produit essentiellement des rhamnoxylanes. Tous ces EPS sont sulfatés (excepté celui de *Flintiella sanguinaria*), parfois avec une teneur élevée (> 10 %) (Soanen *et al.*, 2016 ; Gaignard *et al.*, 2018 ; Percival & Foyle, 1979). Enfin, des taux élevés de Gal ont souvent été observés chez les EPS des Chlorophyta, ce monosaccharide étant le premier ou le second dans 18/23 profils. Cela diffère des EPS des Charophyta ( $p = 0,025$ ) mais pas par rapport aux Rhodophyta ( $p = 0,15$ ) qui ont aussi le Gal comme premier ou second monosaccharide dans 9/13 profils. Certains EPS contiennent des taux élevés d'acides uroniques, comme celui produit par *Stichococcus bacillaris* (~ 20 %) (Barberousse *et al.*, 2006).

Le deuxième règne analysé est celui des Chromista. Les résultats présentés dans la partie III.2.2 ont permis de mettre en évidence des producteurs d'EPS parmi le phylum des Haptophyta. Ainsi, les microalgues Chromista productrices d'EPS appartiennent aux phyla des Ochrophyta, Haptophyta et Miozoa (représenté par 3 espèces mais dont la caractérisation fine de la composition a été réalisée sur seulement 2 polymères, **Tableau 3**). Les principales différences entre les EPS des Ochrophyta et Haptophyta résident dans les différences des teneurs en Fuc ( $p < 0,001$ ) (**Figure 69**). En effet, le Fuc est présent dans la plupart des EPS des Ochrophyta (17/20 profils), occupant la place de premier ou deuxième monosaccharide principal (11/20 profils) alors qu'il n'est présent que chez 2 espèces d'Haptophyta sur les 10 analysées. A titre d'exemple, les souches du genre *Amphora* produisent toutes des EPS principalement composés de Fuc (Khandeparker & Bhosle, 2001 ; Wustman *et al.*, 1997) et les trois souches du genre *Glossomastix* produisent des rhamnofucanes très similaires. Des différences dans les teneurs en Ara peuvent également être observées ( $p < 0,001$ ). Alors que la plupart des EPS des Ochrophyta contiennent au mieux des traces d'Ara (teneur > 3 % dans seulement 4/20 profils), ce monosaccharide est présent à des niveaux significativement plus élevés chez les Haptophyta (teneur > 7 % dans 8/10 profils).

Bien que l'analyse se soit concentrée sur les distinctions des compositions d'EPS entre phyla, des différences de compositions ont été observées chez certaines espèces appartenant au même genre, comme par exemple le genre *Pavlova* (**Tableau 14**, partie II.2). Ces différences pourraient être expliquées par le fait que les *Pavlova* constituent un genre

polyphylétique (**Bendif et al., 2011**). Par ailleurs, une composition particulière a été trouvée pour l'EPS de la microalgue *Heterosigma akashiwo*. Il s'agit du seul EPS de microalgue contenant du ManA (**Lopes et al., 2012**). De même, la composition du polymère de *Gyrodinium impudicum* est particulière car il s'agit d'un homopolysaccharide de type galactane sulfaté (**Yim et al., 2003**).

Enfin, le dernier règne analysé est celui des Cyanobactéries. La production d'EPS par ces microorganismes photosynthétiques a été abondamment publiée, peut-être en raison de leur abondance écologique et de leur croissance plus simple et rapide. Toutes ces données permettent d'avoir une vision élargie sur la grande diversité des compositions d'EPS provenant des Cyanobactéries. La principale spécificité des EPS des Cyanobactéries est la présence systématique du Glc, à l'exception de *Nostoc carneum* (**Parikh & Madamwar, 2006**). Il occupe la place de premier ou deuxième monosaccharide principal dans 63 (48/79 profils) et 18 % (14/79 profils) des compositions, respectivement (**Tableau 3**, partie I.3.4.2.3). En comparaison le Xyl, apparaissant comme monosaccharide principal juste après le Glc, est 7 fois moins présent (7/79 profils). Les osamines (GlcN et/ou GalN) ont été retrouvés dans 21 compositions. De plus, le GlcN est le monosaccharide majoritaire et secondaire chez les EPS de *Rhabdoderma rubrum* et *Synechocystis aquatilis*, respectivement (**Di Pippo et al., 2013 ; Richert et al., 2005**). En outre, on remarque que des espèces appartenant à un même genre produisent des EPS avec des compositions proches. Cela concerne les genres *Synechocystis*, *Phormidium*, *Oscillatoria*, *Leptolyngbya* et *Plectonema*.



**Figure 68, partie 1** : Compositions en oses neutres (Rha, Gal, Ara, Glu, Man, Fuc, Xyl, Rib) et en acides uroniques (UA) (exprimées en % de la composition totale) de 81 souches de microalgues (genres et/ou espèces). Les espèces ont été placées sur l'arbre phylogénétique réalisé à partir de 210 séquences d'ADN codant pour l'ARNr 18S, appartenant à 15 classes différentes et 7 phyla distincts (méthode du Neighbor-Joining, 1260 itérations). Les positions des souches écrites en gras ont été déterminées à partir des séquences correspondant à l'espèce donnée. Pour les autres souches, des séquences appartenant à une espèce du même genre ont été utilisées. ■ : 1<sup>er</sup> monosaccharide majoritaire, ■ : 2<sup>ème</sup> monosaccharide majoritaire, ■ : monosaccharide secondaire, ★ : proportions d'acides uroniques obtenues par dosage colorimétrique, ► : présence de Rib.

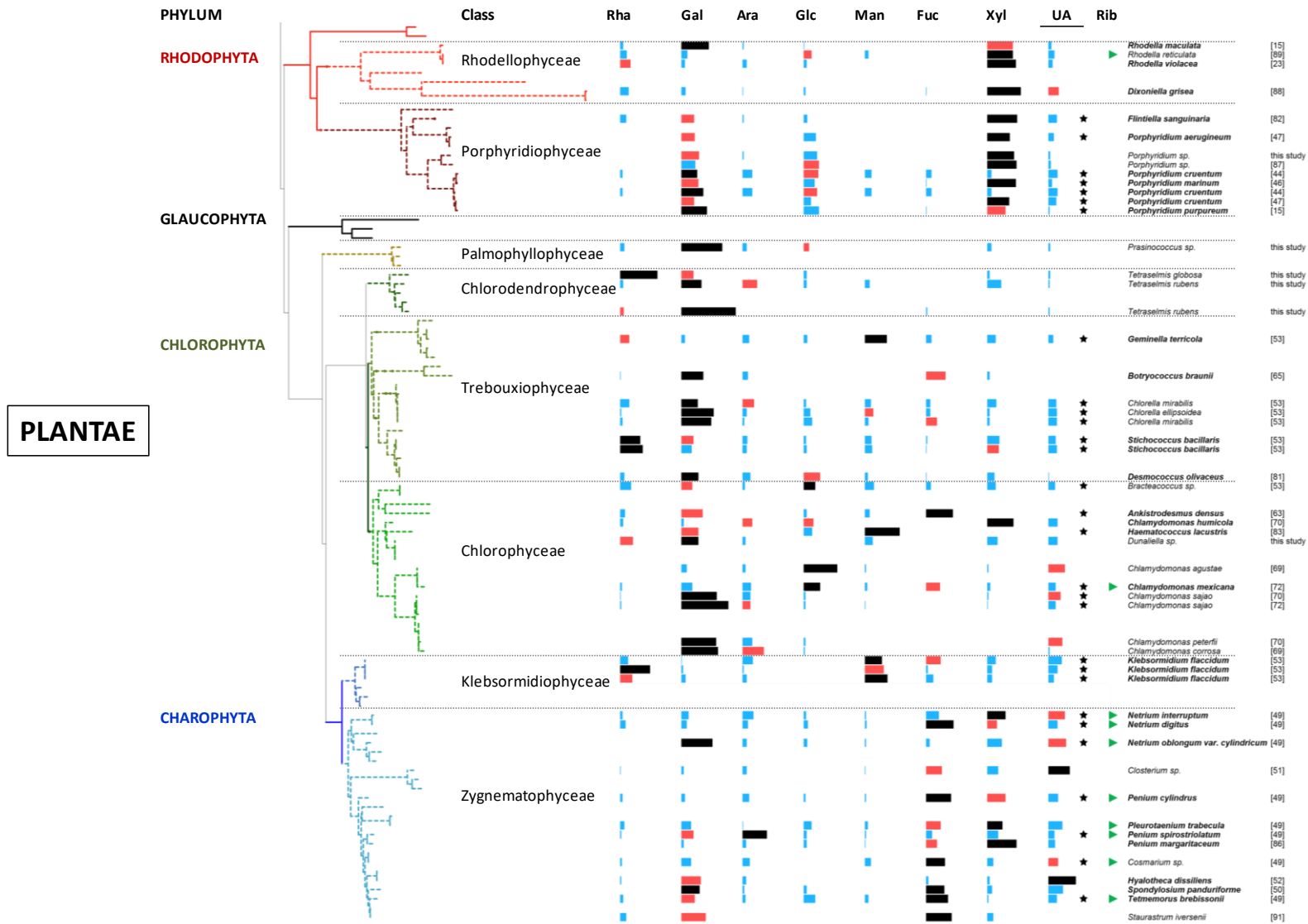
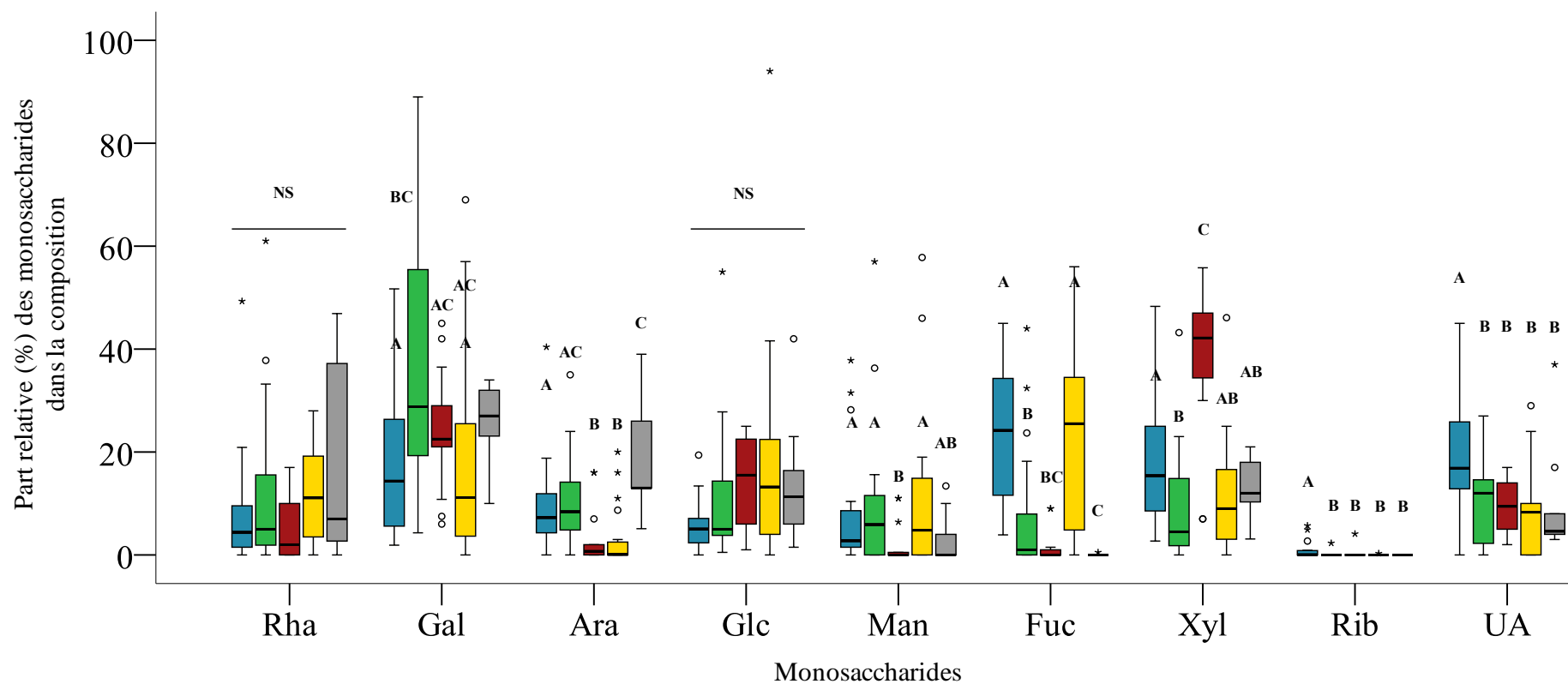


Figure 68, partie 2.



**Figure 69** : Analyses des variations en monosaccharides au sein des EPS produits par les microalgues des phyla Charophyta (■), Chlorophyta (■), Rhodophyta (■), Ochrophyta (■) and Haptophyta (■) (16, 23, 13, 20 et 9 compositions en monosaccharides, respectivement, incluant les données de la bibliographie et les résultats de cette étude). Le phylum des Miozoa n'a pas été inclus dans cette analyse car seulement deux compositions sont disponibles dans la littérature. Les lettres différentes indiquent des différences statistiques significatives entre les phyla. ○ et ★ : valeurs aberrantes non prises en compte. NS: Résultats non significatifs.

## Conclusion

Ce travail a été réalisé au sein de l'axe Génie des Procédés, Energétique et Biosystèmes (GePEB) de l'Institut Pascal (UMR CNRS 6602, Clermont-Ferrand, France), sous la direction de Mme LAROCHE Céline et M. MICHAUD Philippe. Il s'intègre dans le projet ANR POLYSALGUE qui met en jeu différents laboratoires de recherche et un industriel. L'objectif était d'approfondir les connaissances sur la capacité des microorganismes photosynthétiques (microalgues et Cyanobactéries) à produire des EPS, à les caractériser et à comparer les résultats obtenus avec ceux de la littérature afin d'établir un lien entre la structure et l'appartenance phylogénétique. Pour atteindre cet objectif, quatre étapes ont été définies comme suit :

- 166 microalgues et Cyanobactéries provenant de la RCC ont été criblées dans des conditions de culture standards afin d'identifier de nouvelles souches capables d'excréter des polymères dans leur environnement,
- des analyses biochimiques ont été menées sur les EPS identifiés afin de caractériser leur composition en monosaccharides,
- des cultures en PBR ont été menées sur quelques souches afin d'étudier leur potentiel dans des conditions dites semi-industrielles, et caractériser au plus fin leur EPS,
- des analyses statistiques ont été réalisées sur les compositions en monosaccharides des polymères isolés dans ce travail et ceux de la littérature, afin d'identifier un éventuel lien avec l'appartenance phylogénétique des microalgues et Cyanobactéries.

Dans un premier temps, le criblage de 166 souches de microalgues et Cyanobactéries a permis la mise en évidence de 45 souches productrices de glucides extracellulaires (phénotype [EPS+]). La plupart appartenaient au règne des Chromista (30 espèces), 10 espèces appartenaient au règne des Plantae et une seule Cyanobactérie a été identifiée. Des analyses des compositions en monosaccharides ont été réalisées par CPG/SM-IE et CEAHP-DAP sur 20 exopolymères. Tous les EPS isolés étaient des hétéropolysaccharides. Les compositions étaient très diversifiées, et certaines étaient très particulières. A titre d'exemple l'EPS d'*Exanthemachrysis* contenait 37 % d'acides uroniques (GlcA et GalA). Sur les 11 genres testés, 8 sont inédits et n'avaient jamais été étudiés pour la production d'EPS (*Chrysofila*, *Diacronema*, *Exanthemachrysis*, *Glossomastix*, *Isochrysis*, *Pavlova*, *Prasinococcus* et *Tetraselmis*). Ces résultats ont permis de mettre en évidence un 3<sup>ème</sup> phylum avec des espèces

productrices : celui des Haptophyta. De plus, les données sur les souches Ochrophyta et Chlorophyta ont été enrichies avec la découverte des genres *Glossomastix* et *Tetraselmis*, *Prasinococcus*, respectivement.

Dans un deuxième temps, des compositions structurales plus fines ont été déterminées sur 7 EPS. Cinq d'entre eux ont été extraits à la suite de cultures en PBR (*Glossomastix*, *Chrysolita dentata*, *Diacronema*, *Pavlova* et *Exanthemachrysis*). Un a été isolé après une culture d'une autre souche *Glossomastix* en airlift et le dernier provient de la Cyanobactérie *Synechococcus*. Les cultures en PBR ont montré que *Glossomastix* (RCC3688) et *Exanthemachrysis* produisent des EPS de façon continue, sans être en état de carence. Les compositions globales ont été déterminées par des divers dosages et les compositions en monosaccharides ont été déterminées par CPG/SM-IE et CEAHP-DAP. Les résultats ont montré que tous les polymères purifiés sont des hétéropolysaccharides sulfatés. Certains contiennent des taux de sulfates élevés (> 10 %). Les compositions sont extrêmement diversifiées. Les résultats suggèrent l'identification de galactoglucane, rhamnofucane, galactoarabinane, galactorhamnane, galactoxylane et glucuronane.

A l'issue de ces investigations, l'extrait isolé de *Glossomastix* (RCC 3688) a été retenu pour sa caractérisation structurale des liaisons glycosidiques du fait de sa composition (Xyl et Gal) et de sa pureté (86 %). Cette analyse structurale réalisée par CPG/SM-IE a permis de confirmer qu'il s'agissait d'un galactoxylane complexe. Il était constitué d'une chaîne principale de  $\beta$ -(1,3)- et  $\beta$ -(1,4)- D-Xylp, partiellement sulfatée et substituée en positions O-2 et O-3 par des chaînes secondaires et/ou des résidus terminaux tels que D-Xylp-(1→6)-D-Galp, D-Xylp-(1→4)-D-Galp, D-Xylp-(1→3)-D-Galp, Galp-(1→, SF-Xylp-(1→, Xylp-(1→ et Glcp-(1→.

Enfin, une méta-analyse a été réalisée sur 81 compositions en monosaccharides d'EPS de microalgues (données issues de ce travail couplées à celles de la littérature) afin de déterminer si elles pouvaient varier en fonction de l'affiliation taxonomique. Ces organismes producteurs d'EPS ont été replacés sur un arbre phylogénétique. Ces analyses ont permis de mettre en évidence des variations significatives d'un phylum à l'autre pour le Gal, Ara, Man, Fuc, Xyl, Rib et les acides uroniques ( $p < 0,05$ ). En revanche, les taux de Rha et Glc sont relativement constants. Le profil des EPS des Charophyta est distinct de ceux des Chlorophyta et Rhodophyta, avec des taux de Fuc élevés. Ils contiennent aussi des taux élevés d'acides uroniques par rapport aux deux autres phyla (jusqu'à 29 % de la composition totale). La

moitié des EPS isolés des Charophyta contiennent du Rib, ce qui contraste fortement avec les profils des Chlorophyta et Rhodophyta (1/23 et 1/13, respectivement). Les profils des EPS des Rhodophyta sont caractérisés par des taux élevés de Xyl, contrastant avec les Chlorophyta (2/23) et les Charophyta (5/16). Chez les Chromista, la principale différence entre les EPS des Ochrophyta et Haptophyta réside dans les différences des teneurs de Fuc (présents dans 17/20 profils contre 2/10, respectivement). Des différences en Ara ont également été observées. Enfin, les EPS des Cyanobactéries contiennent systématiquement du Glc. Ce monosaccharide est majoritaire ou secondaire dans 63 et 18 % des compositions, respectivement. Les osamines (GlcN et/ou GalN et/ou leurs dérivés) ont été identifiées dans près de 28 % des compositions. Cette découverte est clairement la preuve que l'évolution a conservé des voies de biosynthèse complexes d'EPS spécifiques à chaque phyla, probablement pour donner un avantage aux souches ayant la capacité de produire ces EPS dans certains environnements. Cependant le manque actuel de connaissances sur la fonction physiologique des EPS, malgré l'abondance de littérature sur ce sujet rend difficile la corrélation de certaines structures polysaccharidiques avec leurs rôles biologiques.

En conclusion, les résultats de ce travail ont conduit à la découverte de nouvelles souches productrices d'exopolymères, incluant 8 genres inédits, et à la caractérisation des compositions en monosaccharides de ces derniers. De plus, des cultures en PBR couplées aux analyses des compositions structurales suggèrent que certaines souches pourraient être de bons candidats pour la production d'EPS à grande échelle, du fait de leurs propriétés rhéologiques potentielles et des activités biologiques. Cependant, sur les 45 souches de phénotype [EPS+] détectées lors du criblage, seules 20 d'entre elles ont été mises en culture afin d'étudier la composition monosaccharidique de leur EPS. Pour aller plus loin dans ce travail, il faudrait cultiver les vingt-cinq souches phénotype [EPS+] restantes et étudier la composition en monosaccharides de leur EPS, ce qui permettrait aussi de valider le phénotype [EPS+] de ces souches. Ces résultats permettraient de compléter la méta-analyse réalisée et pourraient permettre la découverte de nouvelles distinctions entre les phyla. Outre les informations liées à la composition monosaccharidique, l'analyse des liaisons glycosidiques a été réalisée sur un unique EPS. Il serait particulièrement intéressant d'effectuer cette analyse sur l'EPS d'*Exanthemacrysis* sp. (RCC1544), potentiel glucuronane, encore jamais décrit à l'état naturel chez les microalgues.





## Références Bibliographiques

<b>A</b>	.....	262
<b>B</b>	.....	263
<b>C</b>	.....	268
<b>D</b>	.....	272
<b>E</b>	.....	276
<b>F</b>	.....	277
<b>G</b>	.....	278
<b>H</b>	.....	283
<b>I</b>	.....	286
<b>J</b>	.....	286
<b>K</b>	.....	287
<b>L</b>	.....	290
<b>M</b>	.....	292
<b>N</b>	.....	297
<b>O</b>	.....	298
<b>P</b>	.....	299
<b>R</b>	.....	303
<b>S</b>	.....	305
<b>T</b>	.....	310
<b>U</b>	.....	312
<b>V</b>	.....	312
<b>W</b>	.....	313
<b>X</b>	.....	315
<b>Y</b>	.....	315
<b>Z</b>	.....	317

## A

---

Abo-Shady, A.M., Mohamed, Y.A., Lasheen, T., 1993. Chemical composition of the cell wall in some green algae species. *Biologia Plantarum*. 35, 629-632.

Ai, X.X., Liang, J.R., Gao, Y.H., Lo, S.C.L., Lee, F.W.F., Chen, C.P., Luo, C.S., Du, C., 2015. MALDI-TOF MS analysis of the extracellular polysaccharides released by the diatom *Thalassiosira pseudonana* under various nutrient conditions. *Journal of applied phycology*. 27, 673-684.

Aikawa, S., Izumi, Y., Matsuda, F., Hasunuma, T., Chang, J.-S., Kondo, A., 2012. Synergistic enhancement of glycogen production in *Arthrospira platensis* by optimization of light intensity and nitrate supply. *Bioresource Technology*. 108, 211-215.

Aizawa, K., Miyachi, S., 1986. Carbonic anhydrase and CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in microalgae and cyanobacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 39, 215-233.

Akimoto, S., Yokono, M., Hamada, F., Teshigahara, A., Aikawa, S., Kondo, A., 2012. Adaptation of light-harvesting systems of *Arthrospira platensis* to light conditions, probed by time-resolved fluorescence spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1817, 1483-1489.

Allan, G.G., Lewin, J., Johnson, P.G., 1972. Marine polymers. IV Diatom polysaccharides. *Botanica Marina*. 15, 102-108.

Allard, B., Tazi, A., 1992. Influence of growth status on composition of extracellular polysaccharides from two *Chlamydomonas* species. *Phytochemistry*. 32, 41-47.

Andersen, R.A., Kim, J.I., Tittley, I., Yoon, H.S., 2014. A re-investigation of *Chrysotila* (Prymnesiophyceae) using material collected from the type locality. *Phycologia*. 53, 463-473.

Arad, S.M., 1988. Production of sulphated polysaccharides from red unicellular algae. *In: Algal Biotechnology*. Stadler, T., Mollion, J., Verdu, M.C., Karamanos, Y., Morvan, H., Christiaen, D. (Eds.). 65-87.

Arad, S.M., 2009. Compositions comprising red microalgae polysaccharides and metals. Patent US8647635B2.

Arad, S.M., Lerental, Y.B., Dubinsky, O., 1992. Effect of nitrate and sulfate starvation on polysaccharide formation in *Rhodella reticulata*. *Bioresource Technology*. 42, 141-148.

Arad, S.M., Huliheil, M., Tal, J., 1997. Antiviral agents. Patent WO1997000689A1.

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

Arad, S.M., Levy-Ontman, O., 2010. Red microalgal cell-wall polysaccharides: biotechnological aspects. *Current Opinion in Biotechnology*. 21, 358-364.

Arad, S.M., Atar, D., 2006. Viscosupplementation with algal polysaccharides in the treatment of arthritis. Patent US9119870B2.

Arad, S.M., Weinstein, Y., 2003. Novel lubricants from red microalgae: interplay between genes and products. *Biomedica*. 32-37.

Arasaki, S., Arasaki, T., 1983. Low calorie, high nutrition: vegetables from the sea to help you look and feel better. Japan Publications, Tokyo.

Armstrong, H., Brasier, M.D., 2005. *Microfossils*, 2<sup>nd</sup> edition. Blackwell Publishing, Malden, USA.

Arumugam, M., Agarwal, A., Arya, M.C., Ahmed, Z., 2013. Influence of nitrogen sources on biomass productivity of microalgae *Scenedesmus bijugatus*. *Bioresource Technology*. 131, 246-249.

## **B**

---

Badger, M.R., 1987. The CO<sub>2</sub>-concentrating mechanism in aquatic phototrophs, *In: Photosynthesis*. Hatch, M.D., Boardman, N.K. (Eds.). 10, 219-274.

Badger, M.R., Andrews, T.J., 1982. Photosynthesis and inorganic carbon usage by the marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp. *Plant Physiology*. 70, 517-523.

- Bae, S.Y., Yim, J.H., Lee, H.K., Pyo, S., 2006. Activation of murine peritoneal macrophages by sulfated exopolysaccharide from marine microalga *Gyrodinium impudicum* (strain KG03): Involvement of the NF- $\kappa$ B and JNK pathway. *International Immunopharmacology*. 6, 473-484.
- Bafana, A., 2013. Characterization and optimization of production of exopolysaccharide from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Carbohydrate Polymers*. 95, 746-752.
- Baker, J.W., Grover, J.P., Brooks, B.W., Ureña-Boeck, F., Roelke, D.L., Errera, R., Kiesling, R.L., 2007. Growth and toxicity of *Prymnesium parvum* (Haptophyta) as a function of salinity, light, and temperature. *Journal of Phycology*. 43, 219-227.
- Barberousse, H., Ruiz, G., Gloaguen, V., Lombardo, R.J., Djediat, C., Mascarell, G., Castaing, J.C., 2006. Capsular polysaccharides secreted by building façade colonisers: characterisation and adsorption to surfaces. *Biofouling*. 22, 361-370.
- Barbosa, M.J., Albrecht, M., Wijffels, R.H., 2003. Hydrodynamic stress and lethal events in sparged microalgae cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. 83, 112-120.
- Barclay, W.R., Lewin, R.A., 1985. Microalgal polysaccharide production for the conditioning of agricultural soils. *Plant Soil*. 88, 159-169.
- Barsanti, L., Vismara, R., Passarelli, V., Gualtieri, P., 2001. Paramylon ( $\beta$ -1,3-glucan) content in wild type and WZSL mutant of *Euglena gracilis*. Effects of growth conditions. *Journal of Applied Phycology*. 13, 59-65.
- Baudelet, P.H., Gagez, A.L., Bérard, J.B., Juin, C., Bridiau, N., Kaas, R., Thiéry, V., Cadoret, J.P., Picot, L., 2013. Antiproliferative activity of *Cyanophora paradoxa* pigments in melanoma, breast and lung cancer cells. *Marine Drugs*. 11, 4390-4406.
- Baudelet, P.H., Ricochon, G., Linder, M., Muniglia, L., 2017. A new insight into cell walls of Chlorophyta. *Algal Research*. 25, 333-371.
- Baylson, F.A., Stevens, B.W., Domozych, D.S., 2001. Composition and synthesis of the pectin and protein components of the cell wall of *Closterium acerosum* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*. 37, 796-809.

- Bayona, K.C., Gallón, S.M.N., Lara, D.R., Colorado, J.R., 2012. Activity of sulfated polysaccharides from microalgae *Porphyridium cruentum* over degenerative mechanisms of the skin. *International Journal of Science and Advanced Technology*. 2, 85-92.
- Beardall, J., Stojkovic, S., Larsen, S., 2009. Living in a high CO<sub>2</sub> world: impacts of global climate change on marine phytoplankton. *Plant Ecology & Diversity*. 2, 191-205.
- Beattie, A., Hirst, E.L., Percival, E., 1961. Studies on the metabolism of the Chrysophyceae. Comparative structural investigations on leucosin (chrysolaminarin) separated from diatoms and laminarin from the brown algae. *Biochemical Journal*. 79, 531-537.
- Becker E.W., 1994. Chemical composition. *In: Microalgae : Biotechnology and Microbiology*. Becker E.W. (Eds.). 177-195.
- Becker, E.W., 2004. Microalgae for aquaculture. The nutritional value of microalgae for aquaculture. *In: Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*. Richmond, A. (Eds.). 380-391.
- Becker, E.W., 2007. Microalgae as a source of protein. *Biotechnology Advances*. 25, 207-210.
- Becker, B., Becker, D., Kamerling, J.P., Melkonian, M., 1991. 2-Keto-sugar acids in green flagellates: a chemical marker for prasinophycean scales. *Journal of Phycology*. 27, 498-504.
- Becker, B., Lommerse, J.P.M., Melkonian, M., Kamerling, J.P., Vliegenthart, J.F.G., 1995. The structure of an acidic trisaccharide component from a cell wall polysaccharide preparation of the green alga *Tetraselmis striata* Butcher. *Carbohydrate Research*. 267, 313-321.
- Becker, B., Melkonian, M., Kamerling, J.P., 1998. The cell wall (theca) of *Tetraselmis Striata* (Chlorophyta): macromolecular composition and structural elements of the complex polysaccharides. *Journal of Phycology*. 34, 779-787.
- Ben-Amotz, A., 1993. Production of  $\beta$ -carotene and vitamins by the halotolerant alga *Dunaliella*. *In: Pharmaceutical and Bioactive Natural Products*. Attaway, D.H., Zaborsky, O.R. (Eds.). 411-417.

Benaoun, F., 2017. Caractérisation structurale et potentiel biologique des polysaccharides issus de *Plantago notata* Lagasca (Plantaginaceae) et *Urginea noctiflora* Batt.Trab (Liliaceae) 231. Thèse de Doctorat, Biologie et santé, Université Clermont-Auvergne et Université Kasdi-Merbah Ouargla.

Bendif, E.M., Probert, I., Hervé, A., Billard, C., Goux, D., Lelong, C., Cadoret, J.P., Véron, B., 2011. Integrative taxonomy of the pavlovophyceae (Haptophyta): a reassessment. *Protist.* 162, 738-761.

Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society B.* 57, 289-300.

Bernal, J., Mendiola, J.A., Ibáñez, E., Cifuentes, A., 2011. Advanced analysis of nutraceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 55, 758-774.

Berteau, O., Mulloy, B., 2003. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology.* 13, 29R-40R.

Bhola, V., Desikan, R., Santosh, S.K., Subburamu, K., Sanniyasi, E., Bux, F., 2011. Effects of parameters affecting biomass yield and thermal behaviour of *Chlorella vulgaris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 111, 377-382.

Bhosle, N.B., Sawant, S.S., Garg, A., Wagh, A.B., 1995. Isolation and partial chemical analysis of exopolysaccharides from the marine fouling diatom *Navicula subinflata*. *Botanica Marina.* 38, 103-110.

Bisalputra, T., Weier, T.E., 1963. The Cell Wall of *Scenedesmus quadricauda*. *American Journal of Botany.* 50, 1011-1019.

Bittner, L., Gobet, A., Audic, S., Romac, S., Egge, E.S., Santini, S., Ogata, H., Probert, I., Edvardsen, B., de Vargas, C., 2013. Diversity patterns of uncultured Haptophytes unravelled by pyrosequencing in Naples Bay. *Molecular Ecology.* 22, 87-101.

Blackwell, J., Parker, K.D., Rudall, K.M., 1967. Chitin fibres of the diatoms *Thalassiosira fluviatilis* and *Cyclotella cryptica*. *Journal of Molecular Biology.* 28, 383-385.

- Blokker, P., Schouten, S., van den Ende, H., de Leeuw, J.W., Hatcher, P.G., Sinninghe Damsté, J.S., 1998. Chemical structure of algaenans from the fresh water algae *Tetraedron minimum*, *Scenedesmus communis* and *Pediastrum boryanum*. *Organic Geochemistry*. 29, 1453-1468.
- Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G., 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*. 54, 484-489.
- Blumreisinger, M., Meindl, D., Loos, E., 1983. Cell wall composition of chlorococcal algae. *Phytochemistry*. 22, 1603-1604.
- Borowitzka, M.A., 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, and fermenters. *In: Progress in Industrial Microbiology, Marine Bioprocess Engineering*. Osinga, R., Tramper, J., Burgess, J.G., Wijffels, R.H. (Eds.). 313-321.
- Bouarab, L., Dauta, A., Loudiki, M., 2004. Heterotrophic and mixotrophic growth of *Micractinium pusillum* Fresenius in the presence of acetate and glucose: effect of light and acetate gradient concentration. *Water Research*. 38, 2706-2712.
- Bougaran, G., Bernard, O., Sciandra, A., 2010. Modeling continuous cultures of microalgae colimited by nitrogen and phosphorus. *Journal of Theoretical Biology*. 265, 443-454.
- Boyer, C., 2009. Étude des transferts du tritium atmosphérique chez la laitue: étude cinétique, état d'équilibre et intégration du tritium sous forme organique lors d'une exposition atmosphérique continue. Thèse de Doctorat, Sciences de la vie et de l'environnement, Université de Franche-Comté.
- Bracey, M.H., Christiansen, J., Tovar, P., Cramer, S.P., Bartlett, S.G., 1994. Spinach carbonic anhydrase: investigation of the zinc-binding ligands by site-directed mutagenesis, elemental analysis, and exafs. *Biochemistry*. 33, 13126-13131.
- Brilman, W., Garcia Alba, L., Veneman, R., 2013. Capturing atmospheric CO<sub>2</sub> using supported amine sorbents for microalgae cultivation. *Biomass and Bioenergy*. 53, 39-47.
- Brown, J.W., Sorhannus, U., 2010. A molecular genetic timescale for the diversification of autotrophic Stramenopiles (Ochrophyta): substantive underestimation of putative fossil ages. *PLoS ONE*. 5, e12759.



Burki, F., 2014. The eukaryotic tree of life from a global phylogenomic perspective. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 6:a016147.

## C

---

Cabanelas, I.T.D., Arbib, Z., Chinalia, F.A., Souza, C.O., Perales, J.A., Almeida, P.F., Druzian, J.I., Nascimento, I.A., 2013. From waste to energy: microalgae production in wastewater and glycerol. *Applied Energy.* 109, 283-290.

Cahoon, L.B., 1999. The role of benthic microalgae in neritic ecosystems. *In: Oceanography and Marine Biology: an annual review.* Alan A.D., Gibson, R.N., Barnes, M. (Eds.). 37, 47-86.

Capek, P., Matulová, M., Combourieu, B., 2008. The extracellular proteoglycan produced by *Rhodella grisea*. *International Journal of Biological Macromolecules.* 43, 390-393.

Carpita, N.C., Shea, E.M., 1988. Linkage structure of carbohydrates by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of partially methylated alditol acetates. *In: Analysis of Carbohydrates by GLC and MS.* Biermann, C.J., McGinnis, G.D. (Eds.). 158-211.

Castenholz, R.W., Wilmotte, A., Herdman, M., Rippka, R., Waterbury, J.B., Iteman, I., Hoffmann, L., 2001. Phylum BX. Cyanobacteria. *In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria.* Boone, D.R., Castenholz, R.W., Garrity, G.M. (Eds.). 1, 473-599.

Cavalier-Smith, T., 1993. Kingdom Protozoa and its 18 phyla. *Microbiological Reviews.* 57, 953-994.

Cavalier-Smith, T., 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews.* 73, 203-266.

Cavalier-Smith, T., 2010. Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. *Biology Letters.* 6, 342-345.

Cavalier-Smith, T., 2018. Kingdom Chromista and its eight phyla: a new synthesis emphasising periplastid protein targeting, cytoskeletal and periplastid evolution, and ancient divergences. *Protoplasma.* 255, 297-357.

- Cawse, P.A., 1967. The determination of nitrate in soil solutions by ultraviolet spectrophotometry. *Analyst*. 92, 311-315.
- Cecchin, M., Benfatto, S., Griggio, F., Mori, A., Cazzaniga, S., Vitulo, N., Delledonne, M., Ballottari, M., 2018. Molecular basis of autotrophic vs mixotrophic growth in *Chlorella sorokiniana*. *Scientific Reports*. 8, 6465.
- Centeno, D.C., Hell, A.F., Braga, M.R., Del Campo, E.M., Casano, L.M., 2016. Contrasting strategies used by lichen microalgae to cope with desiccation-rehydration stress revealed by metabolite profiling and cell wall analysis. *Environmental Microbiology*. 18, 1546-1560.
- Cerón García, M.C., Sánchez Mirón, A., Fernández Sevilla, J.M., Molina Grima, E., García Camacho, F., 2005. Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*: influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition. *Process Biochemistry*. 40, 297-305.
- Certik, M., Shimizu, S., 1999. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 87, 1-14.
- Cheirsilp, B., Cheirsilp, S., 2012. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresource Technology*. 110, 510-516.
- Cheirsilp, B., Mandik, Y.I., Prasertsan, P., 2016. Evaluation of optimal conditions for cultivation of marine *Chlorella* sp. as potential sources of lipids, exopolymeric substances and pigments. *Aquaculture International*. 24, 313-326.
- Chen, F., 1996. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Trends in Biotechnology*. 14, 421-426.
- Chen, L.Z., Li, D.H., Song, L.R., Hu, C.X., Wang, G.H., Liu, Y.D., 2006. Effects of salt stress on carbohydrate metabolism in desert soil alga *Microcoleus vaginatus* Gom. *Journal of Integrative Plant Biology*. 48, 914-919.
- Chen, B., You, W., Huang, J., Yu, Y., Chen, W., 2010a. Isolation and antioxidant property of the extracellular polysaccharide from *Rhodella reticulata*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 26, 833-840.

- Chen, M., Schliep, M., Willows, R.D., Cai, Z.L., Neilan, B.A., Scheer, H., 2010b. A red-shifted chlorophyll. *Science*. 329, 1318-1319.
- Chen, M., Tang, H., Ma, H., Holland, T.C., Ng, K.Y.S., Salley, S.O., 2011. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology*. 102, 1649-1655.
- Chen, F., Zhang, Y., 1997. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. *Enzyme and Microbial Technology*. 20, 221-224.
- Cheng, K.C., Ogden, K.L., 2011. Algal Biofuels: the research. *Chemical Engineering Progress*. 3, 42-47.
- Cheng, Y., Zhou, W., Gao, C., Lan, K., Gao, Y., Wu, Q., 2009. Biodiesel production from Jerusalem artichoke (*Helianthus Tuberosus* L.) tuber by heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 84, 777-781.
- Chia, M.A., Lombardi, A.T., Melão, M. da G.G., Parrish, C.C., 2013. Lipid composition of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae) as a function of different cadmium and phosphate concentrations. *Aquatic Toxicology*. 128-129, 171-182.
- Chiovitti, A., Higgins, M.J., Harper, R.E., Wetherbee, R., Bacic, A., 2003. The complex polysaccharides of the raphid diatom *Pinnularia viridis* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*. 39, 543-554.
- Chiovitti, A., Harper, R.E., Willis, A., Bacic, A., Mulvaney, P., Wetherbee, R., 2005. Variations in the substituted 3-linked mannans closely associated with the silicified walls of diatoms. *Journal of Phycology*. 41, 1154-1161.
- Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 25, 294-306.
- Chisti, Y., 2013. Raceways-based production of algal crude oil. *Green*. 3, 195-216.
- Chisti, Y., 2016. Large-Scale Production of Algal Biomass: Raceway Ponds. *In: Algae Biotechnology: Products and Processes, Green Energy and Technolog.* Bux, F., Chisti, Y. (Eds.). 21-40.

- Chiu, S.Y., Kao, C.Y., Tsai, M.T., Ong, S.C., Chen, C.H., Lin, C.S., 2009. Lipid accumulation and CO<sub>2</sub> utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO<sub>2</sub> aeration. *Bioresource Technology*. 100, 833-838.
- Choi, H.J., Lee, S.M., 2015. Biomass and oil content of microalgae under mixotrophic conditions. *Environmental Engineering Research*. 20, 25-32.
- Choi, H.J., Yu, S.W., 2015. Influence of crude glycerol on the biomass and lipid content of microalgae. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 29, 506-513.
- Choi, S.P., Nguyen, M.T., Sim, S.J., 2010. Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. *Bioresource Technology*. 101, 5330-5336.
- Chopin, T., Kerin, B.F., Mazerolle, R., 1999. Phycocolloid chemistry as a taxonomic indicator of phylogeny in the Gigartinales, Rhodophyceae: a review and current developments using Fourier transform infrared diffuse reflectance spectroscopy. *Phycological Research*. 47, 167-188.
- Chu, F.F., Chu, P.N., Cai, P.J., Li, W.W., Lam, P.K.S., Zeng, R.J., 2013. Phosphorus plays an important role in enhancing biodiesel productivity of *Chlorella vulgaris* under nitrogen deficiency. *Bioresource Technology*. 134, 341-346.
- Ciucanu, I., Costello, C.E., 2003. Elimination of oxidative degradation during the per-O-methylation of carbohydrates. *Journal of the American Chemical Society*. 125, 16213-16219.
- Cohen, E., Arad, S.M., 1989. A closed system for outdoor cultivation of *Porphyridium*. *Biomass*. 18, 59-67.
- Cohen, A.K., Arad, S.M., 1998. Biosynthesis of the cell wall polysaccharide in the red microalga *Rhodella reticulata*. *Israel Journal of Plant Sciences*. 46, 147-153.
- 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. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 48, 1146-1151.
- Cooper, M.B., Smith, A.G., 2015. Exploring mutualistic interactions between microalgae and bacteria in the omics age. *Current Opinion in Plant Biology*. 26, 147-153.

Cornet, J.F., 2010. Calculation of optimal design and ideal productivities of volumetrically lightened photobioreactors using the constructal approach. *Chemical Engineering Science*. 65, 985-998.

Cuaresma, M., Garbayo, I., Vega, J.M., Vílchez, C., 2006. Growth and photosynthetic utilization of inorganic carbon of the microalga *Chlamydomonas acidophila* isolated from Tinto river. *Enzyme and Microbial Technology*. 40, 158-162.

Cuaresma, M., Janssen, M., Vílchez, C., Wijffels, R.H., 2011. Horizontal or vertical photobioreactors? How to improve microalgae photosynthetic efficiency. *Bioresource Technology*. 102, 5129-5137.

## D

---

D’Orazio, N., Gemello, E., Gammone, M.A., de Girolamo, M., Ficoneri, C., Riccioni, G., 2012. Fucoxantin: a treasure from the sea. *Marine Drugs*. 10, 604-616.

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

De Clerck, O., Bogaert, K.A., Leliaert, F., 2012. Diversity and evolution of algae. *In: Advances in Botanical Research*. Piganeau, G. (Eds.). 64, 55-86.

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

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

de Jesus Raposo, M.F., de Morais, A.M.M.B., de Morais, R.M.S.C., 2015. Bioactivity and applications of polysaccharides from marine microalgae. *In: Polysaccharides*. Ramawat K., Mérillon JM. (eds.). 1683-1727.

- De Philippis, R., Sili, C., Tassinato, G., Vincenzini, M., Materassi, R., 1991. Effects of growth conditions on exopolysaccharide production by *Cyanospira capsulata*. *Bioresource Technology*. 38, 101-104.
- De Philippis, R., Margheri, M.C., Pelosi, E., Ventura, S., 1993. Exopolysaccharide production by a unicellular cyanobacterium isolated from a hypersaline habitat. *Journal of Applied Phycology*. 5, 387-394.
- De Philippis, R., Margheri, M.C., Materassi, R., Vincenzini, M., 1998. Potential of unicellular cyanobacteria from saline environments as exopolysaccharide producers. *Applied and Environmental Microbiology*. 64, 1130-1132.
- De Philippis, R., Sili, C., Paperi, R., Vincenzini, M., 2001. Exopolysaccharide-producing Cyanobacteria and their possible exploitation: a review. *Journal of Applied Phycology*. 13, 293-299.
- De Philippis, R., Vincenzini, M., 1998. Exocellular polysaccharides from Cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiology Reviews*. 22, 151-175.
- de Swaaf, M.E., Grobben, G.J., Eggink, G., de Rijk, T.C., van der Meer, P., Sijtsma, L., 2001. Characterisation of extracellular polysaccharides produced by *Cryptocodinium cohnii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57, 395-400.
- Degrenne, B., Pruvost, J., Christophe, G., Cornet, J.F., Cogne, G., Legrand, J., 2010. Investigation of the combined effects of acetate and photobioreactor illuminated fraction in the induction of anoxia for hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 35, 10741-10749.
- DeJongh, D.C., Radford, T., Hribar, J.D., Hanessian, S., Bieber, M., Dawson, G., Sweeley, C.C., 1969. Analysis of trimethylsilyl derivatives of carbohydrates by gas chromatography and mass spectrometry. *Journal of the American Chemical Society*. 91, 1728-1740.
- Del Campo, J.A., Moreno, J., Rodríguez, H., Angeles Vargas, M., Rivas, J., Guerrero, M.G., 2000. Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta). *Journal of Biotechnology*. 76, 51-59.

- Delattre, C., Pierre, G., Laroche, C., Michaud, P., 2016. Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*. 34, 1159-1179.
- Deng, J., Shi, Z.J., Li, X.Z., Liu, H.M., 2013. Soluble polysaccharides isolation and characterization from Rabbiteye Blueberry (*Vaccinium ashei*) fruits. *BioResources*. 8, 405-419.
- Depraetere, O., Pierre, G., Noppe, W., Vandamme, D., Foubert, I., Michaud, P., Muylaert, K., 2015. Influence of culture medium recycling on the performance of *Arthrospira platensis* cultures. *Algal Research*. 10, 48-54.
- Di Pippo, F., Ellwood, N.T.W., Gismondi, A., Bruno, L., Rossi, F., Magni, P., De Philippis, R., 2013. Characterization of exopolysaccharides produced by seven biofilm-forming cyanobacterial strains for biotechnological applications. *Journal of Applied Phycology*. 25, 1697-1708.
- Dillon, H., Somanchi, A., Rao, K., 2007a. Methods and compositions for cholesterol reduction in mammals. Patent US20070167396A1.
- Dillon, H., Somanchi, A., Rao, K., 2007b. Methods and compositions for reducing inflammation and preventing oxidative damage. Patent US20070167398A1.
- Dillon, H., Somanchi, A., Zaman, A., 2007c. Methods and compositions for joint lubrication. Patent US20070167397A1.
- Dillon H., Somanchi, A., Zaman, A., Rao, K., Wolfson, J., 2007d. Methods and compositions for improving the health and appearance of skin. Patent US20070166266A1.
- Dillon J.C., Phan P.A., 1993. Spirulina as a source of proteins in human nutrition. *In: Spiruline algue de vie*. Doumengue, F., Durand-Chastel, H., Toulemont, A. (Eds.). 12, 103-107.
- Dodgson, K.S., Price, R.G., 1962. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochemical Journal*. 84, 106-110.
- Doemel, W.N., Brock, T.D., 1971. The physiological ecology of *Cyanidium caldarium*. *Microbiology*. 67, 17-32.

- Domozych, C.R., Plante, K., Blais, P., Paliulis, L., Domozych, D.S., 1993. Mucilage processing and secretion in the green alga *Closterium*. I. Cytology and Biochemistry. *Journal of Phycology*. 29, 650-659.
- Domozych, D.S., Kort, S., Benton, S., Yu, T., 2005. The extracellular polymeric substance of the green alga *Penium margaritaceum* and its role in biofilm formation. *Biofilms*. 2, 129-144.
- Domozych, D.S., Serfis, A., Kiemle, S.N., Gretz, M.R., 2007. The structure and biochemistry of charophycean cell walls: I. Pectins of *Penium margaritaceum*. *Protoplasma*. 230, 99-115.
- Domozych, D.S., Lambiasse, L., Kiemle, S.N., Gretz, M.R., 2009. Cell-wall development and bipolar growth in the desmid *Penium margaritaceum* (Zygnematophyceae, Streptophyta). *Asymmetry in a Symmetric World. Journal of Phycology*. 45, 879-893.
- Domozych, D.S., 2015. Cell wall evolution and diversity. *In: Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology*. Ramawat, K.G., Mérillon, J.M. (Eds.). 55-79.
- Doucha, J., Straka, F., Lívanský, K., 2005. Utilization of flue gas for cultivation of microalgae (*Chlorella* sp.) in an outdoor open thin-layer photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*. 17, 403-412.
- 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. *Applied Energy*. 88, 3331-3335.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28, 350-356.
- Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S.M., Blanc, P., Chidambara Murthy, K.N., Ravishankar, G.A., 2005. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends in Food Science & Technology*. 16, 389-406.
- Dvir, I., Stark, A.H., Chayoth, R., Madar, Z., Arad, S.M., 2009. Hypocholesterolemic effects of nutraceuticals produced from the red microalga *Porphyridium* sp. in Rats. *Nutrients*. 1, 156-167.



Dvořák, P., Pouličková, A., Hašler, P., Belli, M., Casamatta, D.A., Papini, A., 2015. Species concepts and speciation factors in Cyanobacteria, with connection to the problems of diversity and classification. *Biodiversity and Conservation*. 24, 739-757.

Dweltz, N.E., Colvin, J.R., McInnes, A.G., 1968. Studies on chitan ( $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-linked 2-acetamido-2-deoxy-D-glucan) fibers of the diatom *Thalassiosira fluviatilis*, Hustedt. III. The structure of chitan from x-ray diffraction and electron microscope observations. *Canadian Journal of Chemistry*. 46, 1513-1521.

## E

---

Ebenezer, V., Medlin, L.K., Ki, J.S., 2012. Molecular detection, quantification, and diversity evaluation of microalgae. *Marine Biotechnology*. 14, 129-142.

Eder, M., Lütz-Meindl, U., 2010. Analyses and localization of pectin-like carbohydrates in cell wall and mucilage of the green alga *Netrium digitus*. *Protoplasma*. 243, 25-38.

Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 32, 1792-1797.

Edwardsen, B., Eikrem, W., Green, J.C., Andersen, R.A., Moon-van der Staay, S.Y., Medlin, L.K., 2000. Phylogenetic reconstructions of the Haptophyta inferred from 18S ribosomal DNA sequences and available morphological data. *Phycologia*. 39, 19-35.

EGGE, E., BITTNER, L., ANDERSEN, T., AUDIC, S., DE VARGAS, C., EDVARSDEN, B., 2013. 454 pyrosequencing to describe microbial eukaryotic community composition, diversity and relative abundance: a test for marine Haptophytes. *PLoS ONE*. 8, e74371.

Elboutachfai, R., Delattre, C., Petit, E., Michaud, P., 2011. Polyglucuronic acids: structures, functions and degrading enzymes. *Carbohydrate Polymers*. 84, 1-13.

Eriksen, N., 2008. The technology of microalgal culturing. *Biotechnology Letters*. 30, 1525-1536.

Eteshola, E., Karpasas, M., Arad, S., Gottlieb, M., 1998. Red microalga exopolysaccharides: 2. Study of the rheology, morphology and thermal gelation of aqueous preparations. *Acta Polymerica*. 49, 549-556.

Evans, L.V., Callow, M.E., Percival, E., Fareed, V., 1974. Studies on the synthesis and composition of extracellular mucilage in the unicellular red alga *Rhodella*. *Journal of Cell Science*. 16, 1-21.

## F

---

Fábregas, J., García, D., Morales, E.D., Lamela, T., Otero, A., 1999a. Mixotrophic production of phycoerythrin and exopolysaccharide by the microalga *Porphyridium cruentum*. *Cryptogamie Algologie*. 20, 89-94.

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

Fareed, V.S., Percival, E., 1977. Presence of rhamnose and 3-O methylxylose in the extracellular mucilage from the red alga *Rhodella maculata*. *Carbohydrate research*. 53, 276-277.

Fattom, A., Shilo, M., 1984. *Phormidium* J-1 bioflocculant: production and activity. *Archives of Microbiology*. 139, 421-426.

Fattom, A., Shilo, M., 1985. Production of emulcyan by *Phormidium* J-1: its activity and function. *FEMS Microbiology Letters*. 31, 3-9.

Fernández, 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*. *Biotechnology Letters*. 11, 433-436.

Fidalgo, J.P., Cid, A., Torres, E., Sukenik, A., Herrero, C., 1998. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*. 166, 105-116.

Filisetti-Cozzi, T.M.C.C., Carpita, N.C., 1991. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry*. 197, 157-162.

Fischer, D., Schlösser, U.G., Pohl, P., 1997. Exopolysaccharide production by cyanobacteria grown in closed photobioreactors and immobilized using white cotton towelling. *Journal of Applied Phycology*. 9, 205-213.

Flaibani, A., Olsen, Y., Painter, T.J., 1989. Polysaccharides in desert reclamation: compositions of exocellular proteoglycan complexes produced by filamentous blue-green and unicellular green edaphic algae. *Carbohydrate Research*. 190, 235-248.

Fontaine, T., Simenel, C., Dubreucq, G., Adam, O., Delepierre, M., Lemoine, J., Vorgias, C.E., Diaquin, M., Latgé, J.P., 2000. Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. *The Journal of Biological Chemistry*. 275, 27594-27607.

Ford, C.W., Percival, E., 1965. Carbohydrates of *Phaeodactylum tricornutum*. Part II. A sulphated glucuronomannan. *Journal of the Chemical Society*. 0, 7042-7046.

Forni, C., Telo', F.R., Caiola, M.G., 1997. Comparative analysis of the polysaccharides produced by different species of *Microcystis* (Chroococcales, Cyanophyta). *Phycologia*. 36, 181-185.

Fuentes-Grünewald, C., Bayliss, C., Zanain, M., Pooley, C., Scolamacchia, M., Silkina, A., 2015. Evaluation of batch and semi-continuous culture of *Porphyridium purpureum* in a photobioreactor in high latitudes using Fourier transform infrared spectroscopy for monitoring biomass composition and metabolites production. *Bioresource Technology*. 189, 357-363.

Fukuda, S., Yamamoto, R., Iwamoto, K., Minoda, A., 2018. Cellular accumulation of cesium in the unicellular red alga *Galdieria sulphuraria* under mixotrophic conditions. *Journal of Applied Phycology*. 30, 3057-3061.

Funami, T., 2017. In vivo and rheological approaches for characterizing food oral processing and usefulness of polysaccharides as texture modifiers - a review. *Food Hydrocolloids*. 68, 2-14.

## G

---

Gagez, A.L., Thierry, V., Pasquet, V., Cadoret, J.-P., Picot, L., 2012. Epoxycarotenoids and cancer. Review. *Current Bioactive Compounds*. 8, 109-141

- Gaignard, C., Macao, V., Gardarin, C., Rihouey, C., Picton, L., Michaud, P., Laroche, C., 2018. The red microalga *Flintiella sanguinaria* as a new exopolysaccharide producer. *Journal of Applied Phycology*. 30, 2803-2814.
- Gaignard, C., Gargouch, N., Dubessay, P., Delattre, C., Pierre, G., Laroche, C., Fendri, I., Abdelkafi, S., Michaud, P., 2019. New horizons in culture and valorization of red microalgae. *Biotechnology Advances*. 37, 193-222.
- Gaill, F., Persson, J., Sugiyama, J., Vuong, R., Chanzy, H., 1992. The chitin system in the tubes of deep sea hydrothermal vent worms. *Journal of Structural Biology*. 109, 116-128.
- Galland-Irmouli, A.V., Fleurence, J., Lamghari, R., Luçon, M., Rouxel, C., Barbaroux, O., Bronowicki, J.P., Villaume, C., Guéant, J.L., 1999. Nutritional value of proteins from edible seaweed *Palmaria palmata* (dulse). *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 10, 353-359.
- Gantar, M., Dhandayuthapani, S., Rathinavelu, A., 2012. Phycocyanin induces apoptosis and enhances the effect of topotecan on prostate cell line LNCaP. *Journal of Medicinal Food*. 15, 1091-1095.
- García, J., Green, B.F., Lundquist, T., Mujeriego, R., Hernández-Mariné, M., Oswald, W.J., 2006. Long term diurnal variations in contaminant removal in high rate ponds treating urban wastewater. *Bioresource Technology*. 97, 1709-1715.
- García-González, M., Moreno, J., Manzano, J.C., Florencio, F.J., Guerrero, M.G., 2005. Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis- $\beta$ -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology*. 115, 81-90.
- Gardeva, E., Toshkova, R., Minkova, K., Gigova, L., 2009. Cancer protective action of polysaccharide, derived from red microalga *Porphyridium cruentum* - a biological background. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 23, 783-787.
- Gargouch, N., Karkouch, I., Elleuch, J., Elkahoui, S., Michaud, P., Abdelkafi, S., Laroche, C., Fendri, I., 2018. Enhanced B-phycoerythrin production by the red microalga *Porphyridium marinum*: a powerful agent in industrial applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 120, 2106-2114.

- Garon-Lardière, S., 2004. Etude structurale des polysaccharides pariétaux de l'algue rouge *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniales). Thèse de Doctorat, Chimie, Université de Bretagne Occidentale.
- Garozzo, D., Impallomeni, G., Spina, E., Sturiale, L., 1998. The structure of the exocellular polysaccharide from the cyanobacterium *Cyanospira capsulata*. *Carbohydrate Research*. 307, 113-124.
- Gasljevic, K., Hall, K., Chapman, D., Matthys, E.F., 2008. Drag-reducing polysaccharides from marine microalgae: species productivity and drag reduction effectiveness. *Journal of Applied Phycology*. 20, 299-310.
- Ge, H., Xia, L., Zhou, X., Zhang, D., Hu, C., 2014a. Effects of light intensity on components and topographical structures of extracellular polysaccharides from the cyanobacteria *Nostoc* sp. *Journal of Microbiology*. 52, 179-183.
- Ge, H., Zhang, J., Zhou, X., Xia, L., Hu, C., 2014b. Effects of light intensity on components and topographical structures of extracellular polymeric substances from *Microcoleus vaginatus* (Cyanophyceae). *Phycologia*. 53, 167-173.
- Geider, R., Roche, J.L., 2002. Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *European Journal of Phycology*. 37, 1-17.
- Gelin, F., Volkman, J.K., Largeau, C., Derenne, S., Sinninghe Damsté, J.S., De Leeuw, J.W., 1999. Distribution of aliphatic, nonhydrolyzable biopolymers in marine microalgae. *Organic Geochemistry*. 30, 147-159.
- Geresh, S., Arad, S.M., 1991. The extracellular polysaccharides of the red microalgae: chemistry and rheology. *Bioresource Technology*. 38, 195-201.
- Geresh, S., Dubinsky, O., Arad, S.M., Christiaen, D., Glaser, R., 1990. Structure of 3-O-( $\alpha$ -D-glucopyranosyluronic acid)-L-galactopyranose, an aldobiouronic acid isolated from the polysaccharides of various unicellular red algae. *Carbohydrate Research*. 208, 301-305.
- Geresh, S., Mamontov, A., Weinstein, J., 2002. Sulfation of extracellular polysaccharides of red microalgae: preparation, characterization and properties. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 50, 179-187.

- Geresh, S., Arad, S.M., Levy-Ontman, O., Zhang, W., Tekoah, Y., Glaser, R., 2009. Isolation and characterization of poly- and oligosaccharides from the red microalga *Porphyridium* sp. *Carbohydrate Research*. 344, 343-349.
- Ghasemi, Y., Moradian, A., Mohagheghzadeh, A., Shokravi, S., Morowvat, M.H., 2007. Antifungal and antibacterial activity of the microalgae collected from paddy fields of Iran: characterization of antimicrobial activity of *Chlorococcus dispersus*. *Journal of Biological Sciences*. 7, 904-910.
- Gifuni, I., Olivieri, G., Pollio, A., Marzocchella, A., 2018. Identification of an industrial microalgal strain for starch production in biorefinery context: the effect of nitrogen and carbon concentration on starch accumulation. *New Biotechnology*. 41, 46-54.
- Giordano, M., Beardall, J., Raven, J.A., 2005a. CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution. *Annual Review of Plant Biology*. 56, 99-131.
- Giordano, M., Norici, A., Hell, R., 2005b. Sulfur and phytoplankton: acquisition, metabolism and impact on the environment. *New Phytologist*. 166, 371-382.
- Giordano, M., Prioretti, L., 2016. Sulphur and algae: metabolism, ecology and evolution. *In: The Physiology of Microalgae, Developments in Applied Phycology*. Borowitzka, M.A., Beardall, J., Raven, J.A. (Eds.). 185-209.
- Girolito, D., Vieira, A.A.H., Paulsen, B.S., 2003. Relative increase of deoxy sugars during microbial degradation of an extracellular polysaccharide released by a tropical freshwater *Thalassiosira* Sp. (bacillariophyceae). *Journal of Phycology*. 39, 1109-1115.
- Girolito, D., Vieira, A.A.H., Paulsen, B.S., 2005. Microbial degradation of extracellular polysaccharides released by a tropical strain of *Staurastrum orbiculare* (Zygnematophyceae). *Phycologia*. 44, 671-677.
- Gloaguen, V., Morvan, H., Hoffmann, L., 1995. Released and capsular polysaccharides of Oscillatoriaceae (Cyanophyceae, Cyanobacteria). *Algological Studies*. 78, 53-69.
- Gómez-Ordóñez, E., Rupérez, P., 2011. FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds. *Food Hydrocolloids*. 25, 1514-1520.

- González-Fernández, C., Ballesteros, M., 2012. Linking microalgae and cyanobacteria culture conditions and key-enzymes for carbohydrate accumulation. *Biotechnology Advances*. 30, 1655-1661.
- Gouvêa, S.P., Vieira, A.A.H., Lombardi, A.T., 2002. No effect of N or P deficiency on capsule regeneration in *Staurodesmus convergens* (Zygnematophyceae, Chlorophyta). *Phycologia*. 41, 585-589.
- Gouvêa, S.P., Vieira, A.A.H., Lombardi, A.T., 2005. Copper and cadmium complexation by high molecular weight materials of dominant microalgae and of water from a eutrophic reservoir. *Chemosphere*. 60, 1332-1339.
- Graverholt, O.S., Eriksen, N.T., 2007. Heterotrophic high-cell-density fed-batch and continuous-flow cultures of *Galdieria sulphuraria* and production of phycocyanin. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 77, 69-75.
- Graziella C.Z., Natascia B., Liliana R., Mario R.T., 2013. *In: Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*. Richmond, A., Hu, Q. (Eds.). 225-267.
- Griffiths, H., 2006. Plant biology: designs on Rubisco. *Nature*. 441, 940-941.
- Griffiths, M.J., Garcin, C., van Hille, R.P., Harrison, S.T.L., 2011. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Journal of Microbiological Methods*. 85, 119-123.
- Guaratini, T., Cardozo, K.H.M., Pinto, E., Colepicolo, P., 2009. Comparison of diode array and electrochemical detection in the C30 reverse phase HPLC analysis of algae carotenoids. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 20, 1609-1616.
- Guerin, M., Huntley, M.E., Olaizola, M., 2003. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology*. 21, 210-216.
- Gügi, B., Le Costaouec, T., Burel, C., Lerouge, P., Helbert, W., Bardor, M., 2015. Diatom-specific oligosaccharide and polysaccharide structures help to unravel biosynthetic capabilities in diatoms. *Marine Drugs*. 13, 5993-6018.

Guillard, R.R.L., Ryther, J.H., 1962. Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula Confervacea* (Cleve) Gran. Canadian Journal of Microbiology. 8, 229-239.

Guillou, L., Bachar, D., Audic, S., Bass, D., Berney, C., Bittner, L., Boutte, C., Burgaud, G., de Vargas, C., Decelle, J., del Campo, J., Dolan, J.R., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Holzmann, M., Kooistra, W.H.C.F., Lara, E., Le Bescot, N., Logares, R., Mahé, F., Massana, R., Montresor, M., Morard, R., Not, F., Pawlowski, J., Probert, I., Sauvadet, A.-L., Siano, R., Stoeck, T., Vaulot, D., Zimmermann, P., Christen, R., 2013. The protist ribosomal reference database (PR2): a catalog of unicellular eukaryote small sub-unit rRNA sequences with curated taxonomy. Nucleic Acids Research. 41, D597-D604.

Guiry, M.D., 2012. How many species of algae are there? Journal of Phycology. 48, 1057-1063.

Guiry, M.D., Guiry, G.M., Morrison, L., Rindi, F., Miranda, S.V., Mathieson, A.C., Parker, B.C., Langanen, A., John, D.M., Bárbara, I., Carter, C.F., Kuipers, P., Garbary, D.J., 2014. AlgaeBase: an on-line resource for algae. Cryptogamie, Algologie. 35, 105-115.

Guiry, M.D., Guiry, G.M., 2019. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 04 March 2019.

## H

---

Hadri, F., Besq, A., Guillou, S., Makhloufi, R., 2010. Réduction de la traînée avec une solution de CTAC-NaSal : Étude du glissement à la paroi en géométrie de Couette. Comptes Rendus Mécanique. 338, 152-157.

Hagen, C., Siegmund, S., Braune, W., 2002. Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation. European Journal of Phycology. 37, 217-226.

Han, F., Wang, W., Li, Y., Shen, G., Wan, M., Wang, J., 2013. Changes of biomass, lipid content and fatty acids composition under a light–dark cyclic culture of *Chlorella pyrenoidosa* in response to different temperature. Bioresource Technology. 132, 182-189.



- Hanagata, N., Takeuchi, T., Fukuju, Y., Barnes, D.J., Karube, I., 1992. Tolerance of microalgae to high CO<sub>2</sub> and high temperature. *Phytochemistry*. 31, 3345-3348.
- Harun, R., Singh, M., Forde, G.M., Danquah, M.K., 2010. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14, 1037-1047.
- Hasui, M., Matsuda, M., Okutani, K., Shigeta, S., 1995. In vitro antiviral activities of sulfated polysaccharides from a marine microalga (*Cochlodinium polykrikoides*) against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. *International Journal of Biological Macromolecules*. 17, 293-297.
- Haug, A., Myklestad, S., 1976. Polysaccharides of marine diatoms with special reference to *Chaetoceros* species. *Marine Biology*. 34, 217-222.
- Haxaire, K., Maréchal, Y., Milas, M., Rinaudo, M., 2003. Hydration of polysaccharide hyaluronan observed by IR spectrometry. I. Preliminary experiments and band assignments. *Biopolymers*. 72, 10-20.
- Hecky, R.E., Mopper, K., Kilham, P., Degens, E.T., 1973. The amino acid and sugar composition of diatom cell-walls. *Marine Biology*. 19, 323-331.
- Heimann, K., Huerlimann, R., 2015. Microalgal classification: major classes and genera of commercial microalgal species. *In: Handbook of Marine Microalgae*. Kim, S.-K. (Eds.), 25-41.
- Helm, R.F., Huang, Z., Edwards, D., Leeson, H., Peery, W., Potts, M., 2000. Structural characterization of the released polysaccharide of desiccation-tolerant *Nostoc commune* DRH-1. *Journal of Bacteriology*. 182, 974-982.
- Hemlata, Afreen, S., Fatma, T., 2018. Extraction, purification and characterization of phycoerythrin from *Microchaete* and its biological activities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 13, 84-89.
- Heredia-Arroyo, T., Wei, W., Ruan, R., Hu, B., 2011. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. *Biomass and Bioenergy*. 35, 2245-2253.

- Hernandez, J.P., de-Bashan, L.E., Bashan, Y., 2006. Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalga *Chlorella* spp. co-immobilized with *Azospirillum brasilense*. *Enzyme and Microbial Technology*. 38, 190-198.
- Hibberd, D.J., 1976. The ultrastructure and taxonomy of the Chrysophyceae and Prymnesiophyceae (Haptophyceae): a survey with some new observations on the ultrastructure of the Chrysophyceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 72, 55-80.
- Hirabaru, C., Izumo, A., Fujiwara, S., Tadokoro, Y., Shimonaga, T., Konishi, M., Yoshida, Mayumi, Fujita, N., Nakamura, Y., Yoshida, Masaki, Kuroiwa, T., Tsuzuki, M., 2010. The primitive rhodophyte *Cyanidioschyzon merolae* contains a semiamylopectin-type, but not an amylose-type,  $\alpha$ -glucan. *Plant and Cell Physiology*. 51, 682-693.
- Ho, S.H., Chen, C.Y., Chang, J.S., 2012. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO<sub>2</sub> fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technology*. 113, 244-252.
- Hoagland, K.D., Rosowski, J.R., Gretz, M.R., Roemer, S.C., 1993. Diatom extracellular polymeric substances: function, fine structure, chemistry, and physiology. *Journal of Phycology*. 29, 537-566.
- Hu, C., Liu, Y., Paulsen, B.S., Petersen, D., Klaveness, D., 2003. Extracellular carbohydrate polymers from five desert soil algae with different cohesion in the stabilization of fine sand grain. *Carbohydrate Polymers*. 54, 33-42.
- Hu, Z., Li, Y., Sommerfeld, M., Chen, F., Hu, Q., 2008. Enhanced protection against oxidative stress in an astaxanthin-overproduction *Haematococcus* mutant (Chlorophyceae). *European Journal of Phycology*. 43, 365-376.
- Huang, Z., Liu, Y., Paulsen, B.S., Klaveness, D., 1998. Studies on polysaccharides from three edible species of *Nostoc* (Cyanobacteria) with different colony morphologies: comparison of monosaccharide compositions and viscosities of polysaccharides from field colonies and suspension cultures. *Journal of Phycology*. 34, 962-968.
- Huang, J., Chen, B., You, W., 2005. Studies on separation of extracellular polysaccharide from *Porphyridium cruentum* and its anti-HBV activity in vitro. *Chinese Journal of Marine Drugs*. 24, 18-21.

Huang, J., Liu, L., Yu, Y., Lin, W., Chen, B., Li, M., Rao, X., 2006. Reduction in the blood glucose level of exopolysaccharide of *Porphyridium cruentum* in alloxan-induced diabetic mice. Journal of Fujian Normal University. 22, 77-80.

Huang, C.C., Hung, J.J., Peng, S.H., Chen, C.N.N., 2012. Cultivation of a thermo-tolerant microalga in an outdoor photobioreactor: influences of CO<sub>2</sub> and nitrogen sources on the accelerated growth. Bioresource Technology. 112, 228-233.

Huleihel, M., Ishanu, V., Tal, J., Arad, S.M., 2001. Antiviral effect of red microalgal polysaccharides on Herpes simplex and Varicella zoster viruses. Journal of Applied Phycology. 13, 127-134.

Huheiheh, M., Ishanu, V., Tal, J., Arad, S.M., 2002. Activity of *Porphyridium* sp. polysaccharide against herpes simplex viruses in vitro and in vivo. Journal of Biochemical and Biophysical Methods. 50, 189-200.

Hultberg, M., Jönsson, H.L., Bergstrand, K.J., Carlsson, A.S., 2014. Impact of light quality on biomass production and fatty acid content in the microalga *Chlorella vulgaris*. Bioresource Technology. 159, 465-467.

Huner, N.P.A., Öquist, G., Sarhan, F., 1998. Energy balance and acclimation to light and cold. Trends in Plant Science. 3, 224-230.

## I

---

Iqbal, M., Zafar, S.I., 1993. Effects of photon flux density, CO<sub>2</sub>, aeration rate, and inoculum density on growth and extracellular polysaccharide production by *Porphyridium cruentum*. Folia Microbiologica. 38, 509-514.

## J

---

Jahan, A., Ahmad, I.Z., Fatima, N., Ansari, V.A., Akhtar, J., 2017. Algal bioactive compounds in the cosmeceutical industry: a review. Phycologia. 56, 410-422.

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

Janssen, M., Janssen, M., de Winter, M., Tramper, J., Mur, L.R., Snel, J., Wijffels, R.H., 2000. Efficiency of light utilization of *Chlamydomonas reinhardtii* under medium-duration light/dark cycles. *Journal of Biotechnology*. 78, 123-137.

Jeffrey, S.W., Wright, S.W., 2005. Photosynthetic pigments in marine microalgae: insights from cultures and the sea. *In: Algal cultures, analogues of blooms and applications*. Subba Rao, D. V. (Eds.). 33-90.

Jhaveri, J.H., Murthy, Z.V.P., 2016. A comprehensive review on anti-fouling nanocomposite membranes for pressure driven membrane separation processes. *Desalination*. 379, 137-154.

Jiang, H., Gao, K., 2004. Effects of lowering temperature during culture on the production of polyunsaturated fatty acids in the marine diatom *Phaeodactylum tricoratum* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*. 40, 651-654.

Jin, C., Yu, Z., Peng, S., Feng, K., Zhang, L., Zhou, X., 2018. The characterization and comparison of exopolysaccharides from two benthic diatoms with different biofilm formation abilities. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 90, 1503-1519.

## K

---

Kačuráková, M., Capek, P., Sasinková, V., Wellner, N., Ebringerová, A., 2000. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*. 43, 195-203.

Kamerling, J.P., Gerwig, G.J., Vliegthart, J.F.G., Clamp, J.R., 1975. Characterization by gas-liquid chromatography-mass spectrometry and proton-magnetic-resonance spectroscopy of pertrimethylsilyl methyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycopeptides. *Biochemical Journal*. 151, 491-495.

Kamerling, J.P., Gerwig, G.J., 2007. Strategies for the structural analysis of carbohydrates. *In: Comprehensive Glycoscience*. Kamerling, H. (Eds.). 2, 1-68.

Kang, J.S., Kang, S.H., Lee, J.H., 1999. Cryophilic diatoms *Navicula glaciei* and *N. perminuta* in antarctic coastal environment. I. Morphology and Ecology. *Algae*. 14, 169-179.

- Kaplan, D., Cohen, Z., Abeliovich, A., 1986. Optimal Growth Conditions for *Isochrysis galbana*. *Biomass*. 9, 37-48.
- Kaplan, A., Zenvirth, D., Marcus, Y., Omata, T., Ogawa, T., 1987a. Energization and activation of inorganic carbon uptake by light in Cyanobacteria. *Plant Physiology*. 84, 210-213.
- Kaplan, D., Christiaen, D., Arad, S.M., 1987b. Chelating properties of extracellular polysaccharides from *Chlorella* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 53, 2953-2956.
- Kataoka, H., 2005. Gas chromatography of amines as various derivatives. *In: Journal of Chromatography Library*. Molnár-Perl, I. (Eds.). 70, 364-404.
- Kathiresan, S., Sarada, R., Bhattacharya, S., Ravishankar, G.A., 2007. Culture media optimization for growth and phycoerythrin production from *Porphyridium purpureum*. *Biotechnology and Bioengineering*. 96, 456-463.
- Katiyar, R., Gurjar, B.R., Bharti, R.K., Kumar, A., Biswas, S., Pruthi, V., 2017. Heterotrophic cultivation of microalgae in photobioreactor using low cost crude glycerol for enhanced biodiesel production. *Renewable Energy*. 113, 1359-1365.
- Keeling, P.J., 2013. The number, speed, and impact of plastid endosymbioses in eukaryotic evolution. *Annual Review of Plant Biology*. 64, 583-607.
- Keirse, J., 2003. Spectroscopie infrarouge déportée : mise au point d'un biocapteur pour l'imagerie métabolique et la sécurité microbiologique. Thèse de Doctorat, Chimie, Université Rennes 1.
- Khalil, Z.I., Asker, M.M.S., El-Sayed, S., Kobbia, I.A., 2010. Effect of pH on growth and biochemical responses of *Dunaliella bardawil* and *Chlorella ellipsoidea*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 26, 1225-1231.
- Khandeparker, R.D., Bhosle, N.B., 2001. Extracellular polymeric substances of the marine fouling diatom *Amphora rostrata* Wm.Sm. *Biofouling*. 17, 117-127.
- Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z., Pimenta-Leibowitz, M., Nechev, J., Zilberg, D., 2006. Feeding with arachidonic acid-rich triacylglycerols from the microalga *Parietochloris incisa*

improved recovery of guppies from infection with *Tetrahymena* sp. *Aquaculture*. 255, 142-150.

Kiemle, S.N., Domozych, D.S., Gretz, M.R., 2007. The extracellular polymeric substances of desmids (Conjugatophyceae, Streptophyta): chemistry, structural analyses and implications in wetland biofilms. *Phycologia*. 46, 617-627.

Kloareg, B., Quatrano, R.S., 1988. Structure of the cells walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *In: Oceanography and Marine Biology, An Annual Review*. Barnes, H. (Eds.). 26, 259-315.

Komarek, J., Kaštovský, J., Mares, J., Johansen, J., 2014. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia*. 86, 295-335.

Kozłowska-Szerenos, B., Zieliński, P., Maleszewski, S., 2000. Involvement of glycolate metabolism in acclimation of *Chlorella vulgaris* cultures to low phosphate supply. *Plant Physiology and Biochemistry*. 38, 727-734.

Kraft, G.T., Woelkerling, W.J., 1990. Rhodophyta-systematics and biology. *In: Biology of Marine Plants*. Clayton, M.N., King, R.J. (Eds.). 41-85.

Kröger, N., Bergsdorf, C., Sumper, M., 1994. A new calcium binding glycoprotein family constitutes a major diatom cell wall component. *The EMBO Journal*. 13, 4676-4683.

Kröger, N., Deutzmann, R., Sumper, M., 1999. Polycationic peptides from diatom biosilica that direct silica nanosphere formation. *Science*. 286, 1129-1132.

Kumar, S.R., Hosokawa, M., Miyashita, K., 2013. Fucoxanthin: a marine carotenoid exerting anti-cancer effects by affecting multiple mechanisms. *Marine Drugs*. 11, 5130-5147.

Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 33, 1870-1874.

Kuroda, K.I., 2000. Pyrolysis-trimethylsilylation analysis of lignin: preferential formation of cinnamyl alcohol derivatives. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 56, 79-87.

## L

---

- Lama, L., Nicolaus, B., Calandrelli, V., Manca, M.C., Romano, I., Gambacorta, A., 1996. Effect of growth conditions on endo- and exopolymer biosynthesis in *Anabaena cylindrica* 10C. *Phytochemistry*. 42, 655-659.
- Lamers, P.P., Janssen, M., De Vos, R.C.H., Bino, R.J., Wijffels, R.H., 2012. Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular green microalga. *Journal of Biotechnology*. 162, 21-27.
- Larkum, A.W., 2016. Photosynthesis and light harvesting in algae. *In: The Physiology of Microalgae, Developments in Applied Phycology*. Borowitzka, A.M., Beardall, J., Raven, J.A. (Eds.). 67-87.
- Le Gall, L., Saunders, G.W., 2007. A nuclear phylogeny of the Florideophyceae (Rhodophyta) inferred from combined EF2, small subunit and large subunit ribosomal DNA: establishing the new red algal subclass Corallinophycidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 43, 1118-1130.
- Leandro, S.M., Gil, M.C., Delgadillo, I., 2003. Partial characterisation of exopolysaccharides exuded by planktonic diatoms maintained in batch cultures. *Acta Oecologica*. 24, S49-S55.
- Leliaert, F., Smith, D.R., Moreau, H., Herron, M.D., Verbruggen, H., Delwiche, C.F., Clerck, O.D., 2012. Phylogeny and molecular evolution of the green algae. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 31, 1-46.
- Letunic, I., Bork, P., 2016. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Research*. 44, W242-W245.
- Li, P., Liu, Z., Xu, R., 2001. Chemical characterisation of the released polysaccharide from the cyanobacterium *Aphanothece halophytica* GR02. *Journal of Applied Phycology*. 13, 71-77.
- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., Lan, C.Q., 2008. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 81, 629-636.

- Li, Y., Han, D., Sommerfeld, M., Hu, Q., 2011a. Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococcum* sp. (Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions. *Bioresource Technology*. 102, 123-129.
- Li, H., Li, Z., Xiong, S., Zhang, H., Li, N., Zhou, S., Liu, Y., Huang, Z., 2011b. Pilot-scale isolation of bioactive extracellular polymeric substances from cell-free media of mass microalgal cultures using tangential-flow ultrafiltration. *Process Biochemistry*. 46, 1104-1109.
- Liang, Y., Sarkany, N., Cui, Y., 2009. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters*. 31, 1043-1049.
- Liang, K., Zhang, Q., Gu, M., Cong, W., 2013. Effect of phosphorus on lipid accumulation in freshwater microalga *Chlorella* sp. *Journal of Applied Phycology*. 25, 311-318.
- Lima, X.T., Kimball, A.B., 2011. Skin carotenoid levels in adult patients with psoriasis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 25, 945-949.
- Lindsay, G.J.H., Gooday, G.W., 1985. Action of chitinase on spines of the diatom *Thalassiosira fluviatilis*. *Carbohydrate Polymers*. 5, 131-140.
- Liu, B., Sun, Z., Ma, X., Yang, B., Jiang, Y., Wei, D., Chen, F., 2015. Mutation breeding of extracellular polysaccharide-producing microalga *Cryptocodinium cohnii* by a novel mutagenesis with atmospheric and room temperature plasma. *International Journal of Molecular Sciences*. 16, 8201-8212.
- Liu, Z., Wang, G., 2014. Effect of Fe<sup>3+</sup> on the growth and lipid content of *Isochrysis galbana*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. 32, 47-53.
- Lopes, D.C., Maurer, J.B.B., Stevan-Hancke, F.R., de Oliveira Proença, L.A., Zawadzki-Baggio, S.F., 2012. Chemical analysis of exopolysaccharide fractions and lipid compounds of the microalga *Heterosigma akashiwo* grown in vitro. *Botanica Marina*. 55, 565-580.
- Lourenço, S.O., Barbarino, E., Lavín, P.L., Marquez, U.M.L., Aidar, E., 2004. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. *European Journal of Phycology*. 39, 17-32.



Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193, 265-275.

Luo, H.P., Al-Dahhan, M.H., 2012. Airlift column photobioreactors for *Porphyridium* sp. culturing: Part I. effects of hydrodynamics and reactor geometry. *Biotechnology and Bioengineering*. 109, 932-941.

Lupi, F.M., Fernandes, H.M.L., Sá-Correia, I., Novais, J.M., 1991. Temperature profiles of cellular growth and exopolysaccharide synthesis by *Botryococcus braunii* Kütz UC 58. *Journal of Applied Phycology*. 3, 35-42.

Lupi, F.M., Fernandes, H.M.L., Tomé, M.M., Sá-Correia, I., Novais, J.M., 1994. Influence of nitrogen source and photoperiod on exopolysaccharide synthesis by the microalga *Botryococcus braunii* UC 58. *Enzyme and Microbial Technology*. 16, 546-550.

Lütz-Meindl, U., Brosch-Salomon, S., 2000. Cell wall secretion in the green alga *Micrasterias*. *Journal of Microscopy*. 198, 208-217.

Lv, J.M., Cheng, L.H., Xu, X.H., Zhang, L., Chen, H.L., 2010. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresource Technology*. 101, 6797-6804.

## M

---

Magaletti, E., Urbani, R., Sist, P., Ferrari, C.R., Cicero, A.M., 2004. Abundance and chemical characterization of extracellular carbohydrates released by the marine diatom *Cylindrotheca fusiformis* under N- and P-limitation. *European Journal of Phycology*. 39, 133-142.

Mahboob, S., Rauf, A., Ashraf, M., Sultana, T., Sultana, S., Jabeen, F., Rajoka, M.I., Al-Balawi, H.F.A., Al-Ghanim, K.A., 2012. High-density growth and crude protein productivity of a thermotolerant *Chlorella vulgaris*: production kinetics and thermodynamics. *Aquaculture International*. 20, 455-466.

Mai, T., Johansen, J.R., Pietrasiak, N., Bohunická, M., Martin, M.P., 2018. Revision of the Synechococcales (Cyanobacteria) through recognition of four families including Oculatellaceae fam. nov. and Trichocoleaceae fam. nov. and six new genera containing 14 species. *Phytotaxa*. 365, 1-59.

- Majdoub, H., Mansour, M.B., Chaubet, F., Roudesli, M.S., Maaroufi, R.M., 2009. Anticoagulant activity of a sulfated polysaccharide from the green alga *Arthrospira platensis*. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. 1790, 1377-1381.
- Maksimova, I.V., Bratkovskaya, L.B., Plekhanov, S.E., 2004. Extracellular carbohydrates and polysaccharides of the alga *Chlorella pyrenoidosa* Chick S-39. *Biology Bulletin of the Russian Academy of Sciences*. 31, 175-181.
- Mandal, S., Mallick, N., 2009. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 84, 281-291.
- Mandalam, R.K., Palsson, B.O., 1998. Elemental balancing of biomass and medium composition enhances growth capacity in high-density *Chlorella vulgaris* cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. 59, 605-611.
- Manrique, G.D., Lajolo, F.M., 2002. FT-IR spectroscopy as a tool for measuring degree of methyl esterification in pectins isolated from ripening papaya fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 25, 99-107.
- 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 Research*. 5, 258-263.
- Maréchal, Y., 1997. Interaction configurations of H<sub>2</sub>O molecules in a protein (Stratum Corneum) by infrared spectrometry. *Journal of Molecular Structure*. 416, 133-143.
- Marfaing, H., Lerat, Y., 2007. Les algues ont-elles une place en nutrition ? *Phytothérapie*. 5, 2-5.
- Markou, G., Nerantzis, E., 2013. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnology Advances*. 31, 1532-1542.
- Markou, G., Vandamme, D., Muylaert, K., 2014. Microalgal and cyanobacterial cultivation: the supply of nutrients. *Water Research*. 65, 186-202.

- Marquardt, J., Rehm, A.M., 1995. *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta) from red and green light: characterization of photosystem I and determination of in situ fluorescence spectra of the photosystems. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 30, 49-56.
- Martínez Sancho, M., Jiménez Castillo, J.M., El Yousfi, F., 1997. Influence of phosphorus concentration on the growth kinetics and stoichiometry of the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Process Biochemistry*. 32, 657-664.
- Martin-Jézéquel, V., Hildebrand, M., Brzezinski, M.A., 2000. Silicon metabolism in diatoms: implications for growth. *Journal of Phycology*. 36, 821-840.
- Matsui, M.S., Muizzuddin, N., Arad, S., Marenus, K., 2003. Sulfated polysaccharides from red microalgae have antiinflammatory properties *in vitro* and *in vivo*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 104, 13-22.
- Mayo, A.W., 1997. Effects of temperature and pH on the kinetic growth of unialga *Chlorella vulgaris* cultures containing bacteria. *Water Environment Research*. 69, 64-72.
- Mazliak, P., 1974. *Physiologie Vegetale: Nutrition et Metabolisme*. Herman, Paris.
- McConville, M.J., Bacic, A., Clarke, A.E., 1986. Structural studies of chrysolaminaran from the ice diatom *Stauroneis amphioxys* (Gregory). *Carbohydrate Research*. 153, 330-333.
- McCourt, R.M., Delwiche, C.F., Karol, K.G., 2004. Charophyte algae and land plant origins. *Trends in Ecology & Evolution*. 19, 661-666.
- McCracken, D.A., Cain, J.R., 1981. Amylose in Floridean Starch. *New Phytologist*. 88, 67-71.
- Melis, A., Zhang, L., Forestier, M., Ghirardi, M.L., Seibert, M., 2000. Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*. 122, 127-136.
- Merchuk, J.C., Ronen, M., Giris, S., Arad, S.M., 1998. Light/dark cycles in the growth of the red microalga *Porphyridium* sp. *Biotechnology and Bioengineering*. 59, 705-713.

- Merchuk, J.C., Gluz, M., Mukmenev, I., 2000. Comparison of photobioreactors for cultivation of the red microalga *Porphyridium* sp. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 75, 1119-1126.
- Metting, F.B., 1996. Biodiversity and application of microalgae. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 17, 477-489.
- Michaud, P., Laroche, C., Villay, A., Roussel, M., Diogon, M., Alaoui, H.E., Delbac, F., 2017. Sulphated polysaccharide composition. Patent US9827277B2.
- Mishra, A., Jha, B., 2009. Isolation and characterization of extracellular polymeric substances from micro-algae *Dunaliella salina* under salt stress. *Bioresource Technology*. 100, 3382-3386.
- Mitra, D., van Leeuwen, J.H., Lamsal, B., 2012. Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products. *Algal Research*. 1, 40-48.
- Mizuno, Y., Sato, A., Watanabe, K., Hirata, A., Takeshita, T., Ota, S., Sato, N., Zachleder, V., Tsuzuki, M., Kawano, S., 2013. Sequential accumulation of starch and lipid induced by sulfur deficiency in *Chlorella* and *Parachlorella* species. *Bioresource Technology*. 129, 150-155.
- Mohamed, Z.A., 2008. Polysaccharides as a protective response against microcystin-induced oxidative stress in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* and their possible significance in the aquatic ecosystem. *Ecotoxicology*. 17, 504-516.
- Monsigny, M., Petit, C., Roche, A.C., 1988. Colorimetric determination of neutral sugars by a resorcinol sulfuric acid micromethod. *Analytical Biochemistry*. 175, 525-530.
- Monsoor, M.A., Kalapathy, U., Proctor, A., 2001. Determination of polygalacturonic acid content in pectin extracts by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry*. 74, 233-238.
- Montreuil, J., Spik, G., Chosson, A., Segard, E., Scheppler, N., 1963. Methods of study of the structure of glycoproteins. *Journal De Pharmacie De Belgique*. 18, 529-546.
- 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). *Marine Biotechnology*. 3, 515-521.

- Moore, B.G., Tischer, R.G., 1964. Extracellular polysaccharides of algae: effects on life-support systems. *Science*. 145, 586-587.
- Morales-Sánchez, D., Tinoco-Valencia, R., Kyndt, J., Martinez, A., 2013. Heterotrophic growth of *Neochloris oleoabundans* using glucose as a carbon source. *Biotechnology for Biofuels*. 6, 100.
- Moreno, J., Vargas, M.A., Olivares, H., Rivas, J., Guerrero, M.G., 1998. Exopolysaccharide production by the cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047 in batch and continuous culture. *Journal of Biotechnology*. 60, 175-182.
- Moreno, J., Vargas, M.A., Madiedo, J.M., Muñoz, J., Rivas, J., Guerrero, M.G., 2000. Chemical and rheological properties of an extracellular polysaccharide produced by the cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047. *Biotechnology and Bioengineering*. 67, 283-290.
- Norsker, N.H., Barbosa, M.J., Vermuë, M.H., Wijffels, R.H., 2011. Microalgal production - a close look at the economics. *Biotechnology Advances*. 29, 24-27.
- Moseley, J.L., Chang, C.-W., Grossman, A.R., 2006. Genome-based approaches to understanding phosphorus deprivation responses and PSR1 control in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*. 5, 26-44.
- Muller-Feuga, A., Le Guédes, R., Pruvost, J., 2003. Benefits and limitations of modeling for optimization of *Porphyridium cruentum* cultures in an annular photobioreactor. *Journal of Biotechnology*. 103, 153-163.
- Myklestad, S., Haug, A., Larsen, B., 1972. Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt. II. Preliminary investigation of the extracellular polysaccharide. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 9, 137-144.
- Myklestad, S., Holm-Hansen, O., Vårum, K.M., Volcani, B.E., 1989. Rate of release of extracellular amino acids and carbohydrates from the marine diatom *Chaetoceros affinis*. *Journal of Plankton Research*. 11, 763-773.
- Myklestad, S.M., 1989. Production, chemical structure, metabolism, and biological function of the (1→3)-linked,  $\beta$ 3-D-glucans in diatoms. *Biological Oceanography*. 6, 313-326.

## N

---

Najdenski, H.M., Gigova, L.G., Iliev, I.I., Pilarski, P.S., Lukavský, J., Tsvetkova, I.V., Ninova, M.S., Kussovski, V.K., 2013. Antibacterial and antifungal activities of selected microalgae and Cyanobacteria. *International Journal of Food Science & Technology*. 48, 1533-1540.

Nakajima, T., Volcani, B.E., 1969. 3,4-dihydroxyproline: a new amino acid in diatom cell walls. *Science*. 164, 1400-1401.

Ndiaye, M., Gadoin, E., Gentric, C., 2018. CO<sub>2</sub> gas-liquid mass transfer and kLa estimation: numerical investigation in the context of airlift photobioreactor scale-up. *Chemical Engineering Research and Design*. 133, 90-102.

Nguyen, R.T., Harvey, H.R., Zang, X., van Heemst, J.D.H., Hetényi, M., Hatcher, P.G., 2003. Preservation of algaenan and proteinaceous material during the oxic decay of *Botryococcus braunii* as revealed by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *Organic Geochemistry*. 34, 483-497.

Nguyen, M.T., Choi, S.P., Lee, J., Lee, J.H., Sim, S.J., 2009. Hydrothermal acid pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. *Journal of microbiology and biotechnology*. 19, 161-166.

Nicolaus, B., Panico, A., Lama, L., Romano, I., Manca, M.C., De Giulio, A., Gambacorta, A., 1999. Chemical composition and production of exopolysaccharides from representative members of heterocystous and non-heterocystous cyanobacteria. *Phytochemistry*. 52, 639-647.

Nie, Z., Xia, J., Levert, J.M., 2002. Fractionation and characterization of polysaccharides from cyanobacterium *Spirulina (Arthrospira) maxima* in nitrogen-limited batch culture. *Journal of Central South University of Technology*. 9, 81-86.

Nimrod, A., Greenman, B., 1988. Heavy metal salts of hyaluronic acid and their use as antimicrobial agents. Patent US4746504A.

Northcote, D.H., Goulding, K.J., Horne, R.W., 1958. The chemical composition and structure of the cell wall of *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochemical Journal*. 70, 391-397.

Nosál'ová, G., Capek, P., Matáková, T., Nosál', S., Flešková, D., Jureček, E., 2012. Antitussive activity of an extracellular *Rhodella grisea* proteoglycan on the mechanically induced cough reflex. *Carbohydrate Polymers*. 87, 752-756.

Not, F., Siano, R., Kooistra, W.H.C.F., Simon, N., Vaultot, D., Probert, I., 2012. Diversity and ecology of eukaryotic marine phytoplankton. *In: Advances in Botanical Research*. Piganeau, G. (Eds.). 1-53.

Nürnberg, D.J., Morton, J., Santabarbara, S., Telfer, A., Joliot, P., Antonaru, L.A., Ruban, A.V., Cardona, T., Krausz, E., Boussac, A., Fantuzzi, A., Rutherford, A.W., 2018. Photochemistry beyond the red limit in chlorophyll f-containing photosystems. *Science*. 360, 1210-1213.

## O

---

Oertel, A., Aichinger, N., Hochreiter, R., Thalhamer, J., Lütz-Meindl, U., 2004. Analysis of mucilage secretion and excretion in *Micrasterias* (Chlorophyta) by means of immunoelectron microscopy and digital time lapse video microscopy. *Journal of Phycology*. 40, 711-720.

Ogawa, K., Yamaura, M., Maruyama, I., 1997. Isolation and identification of 2-*O*-methyl-1-rhamnose and 3-*O*-methyl-1-rhamnose as constituents of an acidic polysaccharide of *Chlorella vulgaris*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 61, 539-540.

Ogawa, K., Yamaura, M., Ikeda, Y., Kondo, S., 1998. New aldobiuronic acid, 3-*O*- $\alpha$ -D-glucopyranuronosyl-L-rhamnopyranose, from an acidic polysaccharide of *Chlorella vulgaris*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 62, 2030-2031.

Ogawa, K., Ikeda, Y., Kondo, S., 1999. A new trisaccharide,  $\alpha$ -D-glucopyranuronosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -l-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -l-rhamnopyranose from *Chlorella vulgaris*. *Carbohydrate Research*. 321, 128-131.

Ogawa, K., Arai, M., Naganawa, H., Ikeda, Y., Kondo, S., 2001. A New  $\beta$ -D-galactan having 3-*O*-methyl-D-galactose from *Chlorella vulgaris*. *Journal of Applied Glycoscience*. 48, 325-330.

Ogawa, Y., Kimura, S., Wada, M., 2011. Electron diffraction and high-resolution imaging on highly-crystalline  $\beta$ -chitin microfibril. *Journal of Structural Biology*. 176, 83-90.

Ogawa, T., Ogren, W.L., 1985. Action spectra for accumulation of inorganic carbon in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Photochemistry and Photobiology*. 41, 583-587.

Oh, S.H., Han, J.G., Kim, Y., Ha, J.H., Kim, S.S., Jeong, M.H., Jeong, H.S., Kim, N.Y., Cho, J.S., Yoon, W.B., Lee, S.Y., Kang, D.H., Lee, H.Y., 2009. Lipid production in *Porphyridium cruentum* grown under different culture conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 108, 429-434.

Otero, A., Vincenzini, M., 2004. *Nostoc* (cyanophyceae) goes nude: extracellular polysaccharides serve as a sink for reducing power under unbalanced c/n metabolism. *Journal of Phycology*. 40, 74-81.

Ozturk, S., Aslim, B., 2010. Modification of exopolysaccharide composition and production by three cyanobacterial isolates under salt stress. *Environmental Science and Pollution Research*. 17, 595-602.

## P

---

Pandey, V.D., Pandey, A., Sharma, V., 2013. Biotechnological applications of cyanobacterial phycobiliproteins. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2, 89-97.

Pangestuti, R., Kim, S.K., 2011. Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. *Journal of Functional Foods*. 3, 255-266.

Panoff, J.M., Priem, B., Morvan, H., Joset, F., 1988. Sulphated exopolysaccharides produced by two unicellular strains of Cyanobacteria, *Synechocystis* PCC 6803 and 6714. *Archives of Microbiology*. 150, 558-563.

Parikh, A., Madamwar, D., 2006. Partial characterization of extracellular polysaccharides from Cyanobacteria. *Bioresource Technology*. 97, 1822-1827.

Park, J.K., Kim, Z.H., Lee, C.G., Synytsya, A., Jo, H.S., Kim, S.O., Park, J.W., Park, Y., 2011. Characterization and immunostimulating activity of a water-soluble polysaccharide isolated from *Haematococcus lacustris*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 16, 1090-1098.



Park, G.T., Go, R.E., Lee, H.M., Lee, G.A., Kim, C.W., Seo, J.W., Hong, W.K., Choi, K.C., Hwang, K.A., 2017. Potential anti-proliferative and immunomodulatory effects of marine microalgal exopolysaccharide on various human cancer cells and lymphocytes in vitro. *Marine Biotechnology*. 19, 136-146.

Pasquet, V., 2011. Recherche bioguidée de molécules anticancéreuses issues de microalgues marines. Thèse de Doctorat, Biochimie, Université de La Rochelle.

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*. *Bioresource Technology*. 145, 345-350.

Patton, C.J., Crouch, S.R., 1977. Spectrophotometric and kinetics investigation of the Berthelot reaction for the determination of ammonia. *Analytical Chemistry*. 49, 464-469.

Paul, N.A., Tseng, C.K., Borowitzka, M., 2012. Seaweed and Microalgae. *In: Aquaculture: Farming Aquatic Animals and Plants*. Lucas, J.S., Southgate, P.C. (Eds.). 2, 268-293.

Paulsen, B.S., Haug, A., Myklestad, S.M., Szabo-Lin, I., 1974. Production of carbohydrate by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *Willei* (Gran) Hustedt. III. Structural studies of the extracellular polysaccharide. *Acta Chemica Scandinavica*. 28, 662-666.

Paulsen, B.S., Haug, A., Myklestad, S.M., 1975. Structural studies of the extracellular polysaccharide produced by the diatom *Chaetoceros curvisetus* Cleve. *Acta chemica Scandinavica. Series B: Organic chemistry and biochemistry*. 29, 337-340.

Paulsen, B.S., Aslaksen, T., Freire-Nordi, C.S., Vieira, A.A.H., 1998. Extracellular polysaccharides from *Ankistrodesmus Densus* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*. 34, 638-641.

Paulsen, B.S., Myklestad, S., 1978. Structural studies of the reserve glucan produced by the marine diatom *Skeletonema costatum* (grev.) Cleve. *Carbohydrate Research*. 62, 386-388.

Paulsen, B.S., Vieira, A.A.H., 1994. Structure of the capsular and extracellular polysaccharides produced by the desmid *Spondylosium panduriforme* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*. 30, 638-641.

- Peña, M.J., Tuomivaara, S.T., Urbanowicz, B.R., O'Neill, M.A., York, W.S., 2012. Methods for structural characterization of the products of cellulose- and xyloglucan-hydrolyzing enzymes. *In: Methods in Enzymology, Cellulases*. Gilbert, H.J. (Ed.). 121-139.
- Percival, E., Foyle, R.A.J., 1979. The extracellular polysaccharides of *Porphyridium cruentum* and *Porphyridium aerugineum*. *Carbohydrate Research*. 72, 165-176.
- Pereira, S., Zille, A., Micheletti, E., Moradas-Ferreira, P., De Philippis, R., Tamagnini, P., 2009. Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly. *FEMS Microbiology Reviews*. 33, 917-941.
- Perez-Garcia, O., De-Bashan, L.E., Hernandez, J.-P., Bashan, Y., 2010. Efficiency of growth and nutrient uptake from wastewater by heterotrophic, autotrophic, and mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* immobilized with *Azospirillum brasilense*. *Journal of Phycology*. 46, 800-812.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F.M.E., de-Bashan, L.E., Bashan, Y., 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*. 45, 11-36.
- Perez-Garcia, O., Bashan, Y., 2015. Microalgal heterotrophic and mixotrophic culturing for bio-refining: from metabolic routes to techno-economics. *In: Algal Biorefineries: Products and Refinery Design*. Prokop, A., Bajpai, R.K., Zappi, M.E. (Eds.). 2, 61-131.
- Pfister, C.A., Lobban, C.S., Harrison, P.J., 1997. The ecology and physiology of seaweeds. *Ecology*. 76, 23-41.
- Phélippé, M., Gonçalves, O., Thouand, G., Cogne, G., Laroche, C., 2019. Characterization of the polysaccharides chemical diversity of the cyanobacteria *Arthrospira platensis*. *Algal Research*. 38, 101426.
- Phlips, E.J., Zeman, C., Hansen, P., 1989. Growth, photosynthesis, nitrogen fixation and carbohydrate production by a unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. (Cyanophyta). *Journal of Applied Phycology*. 1, 137-145.
- Pieper, S., Unterrieser, I., Mann, F., Mischnick, P., 2012. A new arabinomannan from the cell wall of the chlorococcal algae *Chlorella vulgaris*. *Carbohydrate Research*. 352, 166-176.

- Pierre, G., Graber, M., Rafiliposon, B.A., Dupuy, C., Orvain, F., De Crignis, M., Maugard, T., 2012. Biochemical composition and changes of extracellular polysaccharides (ECPS) produced during microphytobenthic biofilm development (Marennes-Oléron, France). *Microbial Ecology*. 63, 157-169.
- Pierre, G., Zhao, J.M., Orvain, F., Dupuy, C., Klein, G.L., Graber, M., Maugard, T., 2014. Seasonal dynamics of extracellular polymeric substances (EPS) in surface sediments of a diatom-dominated intertidal mudflat (Marennes–Oléron, France). *Journal of Sea Research*. 92, 26-35.
- Pignolet, O., Jubeau, S., Vaca-Garcia, C., Michaud, P., 2013. Highly valuable microalgae: biochemical and topological aspects. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 40, 781-796.
- Poddar, N., Sen, R., Martin, G.J.O., 2018. Glycerol and nitrate utilisation by marine microalgae *Nannochloropsis salina* and *Chlorella* sp. and associated bacteria during mixotrophic and heterotrophic growth. *Algal Research*. 33, 298-309.
- Popper, Z.A., Tuohy, M.G., 2010. Beyond the green: understanding the evolutionary puzzle of plant and algal cell walls. *Plant Physiology*. 153, 373-383.
- Portis, A.R., Parry, M.A.J., 2007. Discoveries in Rubisco (Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase): a historical perspective. *Photosynthesis Research*. 94, 121-143.
- Potter, A., Thibaut, S., Ribaut, C., 2013. Utilisation de polysaccharides sulfatés comme agent antipelliculaire. Patent WO2013093307A1.
- Potter, A., Ghibaudo, M., Baltenneck, C., 2014. Association de polysaccharides sulfatés et de C-glycoside et leurs utilisations. Patent WO2014174188A1.
- Powell, N., Shilton, A., Chisti, Y., Pratt, S., 2009. Towards a luxury uptake process via microalgae - defining the polyphosphate dynamics. *Water Research*. 43, 4207-4213.
- Prasanna, P.H.P., 2018. Bacterial exopolysaccharides and their applications in the food industry. *In: Recent Advances in Biotechnology : Progress in Food Biotechnology*. Osman, A. (Eds.). 50-80.

Pruvost, J., Cornet, J.F., 2012. Knowledge models for the engineering and optimization of photobioreactors. *In: Microalgal Biotechnology: Potential and Production*. Posten, C., Walter, C. (Eds.). 181-224.

## R

---

Razaghi, A., Godhe, A., Albers, E., 2014. Effects of nitrogen on growth and carbohydrate formation in *Porphyridium cruentum*. *Central European Journal of Biology*. 9, 156-162.

Reboloso Fuentes, M.M., García Sánchez, J.L., Fernández Sevilla, J.M., Acién Fernández, F.G., Sánchez Pérez, J.A., Molina Grima, E., 1999. Outdoor continuous culture of *Porphyridium cruentum* in a tubular photobioreactor: quantitative analysis of the daily cyclic variation of culture parameters. *Journal of Biotechnology*. 70, 271-288.

Reboloso Fuentes, M.M., Acién Fernández, G.G., Sánchez Pérez, J.A., Guil Guerrero, J.L., 2000. Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. *Food Chemistry*. 70, 345-353.

Reddy, K.J., Soper, B.W., Tang, J., Bradley, R.L., 1996. Phenotypic variation in exopolysaccharide production in the marine, aerobic nitrogen-fixing unicellular cyanobacterium *Cyanothece* sp. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 12, 311-318.

Remias, D., Pichrtová, M., Pangratz, M., Lütz, C., Holzinger, A., 2016. Ecophysiology, secondary pigments and ultrastructure of *Chlainomonas* sp. (Chlorophyta) from the european alps compared with *Chlamydomonas nivalis* forming red snow. *FEMS Microbiology Ecology*. 92.

Riccioni, G., D'Orazio, N., Franceschelli, S., Speranza, L., 2011. Marine carotenoids and cardiovascular risk markers. *Marine Drugs*. 9, 1166-1175.

Richert, L., Golubic, S., Guédès, R.L., Ratiskol, J., Payri, C., Guezennec, J., 2005. Characterization of exopolysaccharides produced by cyanobacteria isolated from Polynesian microbial mats. *Current Microbiology*. 51, 379-384.

Rickman, M., Pellegrino, J., Davis, R., 2012. Fouling phenomena during membrane filtration of microalgae. *Journal of Membrane Science*. 423-424, 33-42.

- Ritz, M., Thomas, J.C., Spilar, A., Etienne, A.L., 2000. Kinetics of photoacclimation in response to a shift to high light of the red alga *Rhodella violacea* adapted to low irradiance. *Plant Physiology*. 123, 1415-1426.
- Rizwan, M., Mujtaba, G., Lee, K., 2017. Effects of iron sources on the growth and lipid/carbohydrate production of marine microalga *Dunaliella tertiolecta*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 22, 68-75.
- Rochaix, J., 2001. Assembly, function, and dynamics of the photosynthetic machinery in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*. 127, 1394-1398.
- 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. *Biotechnology and Bioengineering*. 102, 100-112.
- Rodríguez, M.C., Nosedá, M.D., Cerezo, A.S., 1999. The fibrillar polysaccharides and their linkage to algaenan in the trilaminar layer of the cell wall of *Coelastrum sphaericum* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*. 35, 1025-1031.
- Rossi, F., De Philippis, R., 2016. Exocellular polysaccharides in microalgae and cyanobacteria: chemical features, role and enzymes and genes involved in their biosynthesis. *In: The Physiology of Microalgae, Developments in Applied Phycology*. Borowitzka, M.A., Beardall, J., Raven, J.A. (Eds.). 565-590.
- Rossi, F., Micheletti, E., Bruno, L., Adhikary, S.P., Albertano, P., Philippis, R.D., 2012. Characteristics and role of the exocellular polysaccharides produced by five cyanobacteria isolated from phototrophic biofilms growing on stone monuments. *Biofouling*. 28, 215-224.
- Roussel, M., Villay, A., Delbac, F., Michaud, P., Laroche, C., Roriz, D., El Alaoui, H., Diogon, M., 2015. Antimicrosporidian activity of sulphated polysaccharides from algae and their potential to control honeybee nosemosis. *Carbohydrate Polymers*. 133, 213-220.
- Rowlett, R.S., Chance, M.R., Wirt, M.D., Sidelinger, D.E., Royal, J.R., Woodroffe, M., Wang, Y.F.A., Saha, R.P., Lam, M.G., 1994. Kinetic and structural characterization of spinach carbonic anhydrase. *Biochemistry*. 33, 13967-13976.

Ruiz-Ruiz, F., Benavides, J., Rito-Palomares, M., 2013. Scaling-up of a B-phycoerythrin production and purification bioprocess involving aqueous two-phase systems: practical experiences. *Process Biochemistry*. 48, 738-745.

Rupérez, P., Saura-Calixto, F., 2001. Dietary fibre and physicochemical properties of edible Spanish seaweeds. *European Food Research and Technology*. 212, 349-354.

## S

---

Sajdak, M., Chrubasik, M., Muzyka, R., 2017. Chemical characterisation of tars from the thermal conversion of biomass by 1D and 2D gas chromatography combined with silylation. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 124, 426-438.

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

Sánchez, J.F., Fernández, J.M., Ación, F.G., Rueda, A., Pérez-Parra, J., Molina, E., 2008. Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. *Process Biochemistry*. 43, 398-405.

Sangar, V.K., Dugan, P.R., 1972. Polysaccharide produced by *Anacystis nidulans*: its ecological implication. *Applied Microbiology*. 24, 732-734.

Santek, B., Friehs, K., Lotz, M., Flaschel, E., 2012. Production of paramylon, a  $\beta$ -1,3-glucan, by heterotrophic growth of *Euglena gracilis* on potato liquor in fed-batch and repeated-batch mode of cultivation. *Engineering in Life Sciences*. 12, 89-94.

Sato, A., Matsumura, R., Hoshino, N., Tsuzuki, M., Sato, N., 2014. Responsibility of regulatory gene expression and repressed protein synthesis for triacylglycerol accumulation on sulfur-starvation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Frontiers in Plant Science*. 5.

Schirrmeister, B.E., Vos, J.M. de, Antonelli, A., Bagheri, H.C., 2013. Evolution of multicellularity coincided with increased diversification of cyanobacteria and the Great Oxidation Event. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110, 1791-1796.

- Schmidt, R.A., Wiebe, M.G., Eriksen, N.T., 2005. Heterotrophic high cell-density fed-batch cultures of the phycocyanin-producing red alga *Galdieria sulphuraria*. *Biotechnology and Bioengineering*. 90, 77-84.
- Schopf, J.W., 2000. The fossil record: tracing the roots of the cyanobacterial lineage. *In: The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*. Whitton, B.A., Potts, M. (Eds.). 13-35.
- Schwenzfeier, A., Wierenga, P.A., Gruppen, H., 2011. Isolation and characterization of soluble protein from the green microalgae *Tetraselmis* sp. *Bioresource Technology*. 102, 9121-9127.
- Sekar, S., Chandramohan, M., 2008. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. *Journal of Applied Phycology*. 20, 113-136.
- Seoane, S., Zapata, M., Orive, E., 2009. Growth rates and pigment patterns of Haptophytes isolated from estuarine waters. *Journal of Sea Research*. 62, 286-294.
- Sergejevová, M., Malapascua, J.R., Kopecký, J., Masojídek, J., 2015. Photobioreactors with Internal Illumination. *In: Algal Biorefineries: Products and Refinery Design*. Prokop, A., Bajpai, R.K., Zappi, M.E. (Eds.). 2, 213-236.
- Shah, V., Ray, A., Garg, N., Madamwar, D., 2000. Characterization of the extracellular polysaccharide produced by a marine cyanobacterium, *Cyanothece* sp. ATCC 51142, and its exploitation toward metal removal from solutions. *Current Microbiology*. 40, 274-278.
- Shareef, A., Parnis, C.J., Angove, M.J., Wells, J.D., Johnson, B.B., 2004. Suitability of *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide and *N*-(tert-butyldimethylsilyl)-*N*-methyltrifluoroacetamide as derivatization reagents for the determination of the estrogens estrone and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. 1026, 295-300.
- Shimonaga, T., Fujiwara, S., Kaneko, M., Izumo, A., Nihei, S., Francisco, P.B., Satoh, A., Fujita, N., Nakamura, Y., Tsuzuki, M., 2006. Variation in storage  $\alpha$ -polyglucans of red algae: amylose and semi-amylopectin types in *Porphyridium* and glycogen type in *Cyanidium*. *Marine Biotechnology*. 9, 192-202.

- Shimonaga, T., Konishi, M., Oyama, Y., Fujiwara, S., Satoh, A., Fujita, N., Colleoni, C., Buléon, A., Putaux, J.L., Ball, S.G., Yokoyama, A., Hara, Y., Nakamura, Y., Tsuzuki, M., 2008. Variation in storage  $\alpha$ -glucans of the Porphyridiales (Rhodophyta). *Plant and Cell Physiology*. 49, 103-116.
- Shnyukova, E.I., Zolotareva, E.K., 2015. Diatom exopolysaccharides: a review. *International Journal on Algae*. 17, 50-67.
- Shnyukova, E.I., Zolotareva, E.K., 2017. Ecological role of exopolysaccharides of Bacillariophyta: a review. *Algologia*. 27, 22-44.
- Shrestha, R.P., 1999. A non-covalently bound cell-wall glycoprotein of the red microalga *Porphyridium* sp.: characterization and functions. Thesis.
- Shrestha, R.P., Weinstein, Y., Bar-Zvi, D., Arad, S.M., 2004. A glycoprotein noncovalently associated with cell-wall polysaccharide of the red microalga *Porphyridium* sp. (Rhodophyta). *Journal of Phycology*. 40, 568-580.
- Silberfeld, T., Rousseau F., B. de Reviere, 2014. An updated classification of brown algae (Ochrophyta, Phaeophyceae). *Cryptogamie, Algologie*. 35, 117-156
- Silva, H.R., Prete, C.E.C., Zambrano, F., de Mello, V.H., Tischer, C.A., Andrade, D.S., 2016. Combining glucose and sodium acetate improves the growth of *Neochloris oleoabundans* under mixotrophic conditions. *AMB Express*. 6.
- Sinetova, M.P., Markelova, A.G., Los, D.A., 2006. The effect of nitrogen starvation on the ultrastructure and pigment composition of chloroplasts in the acidothermophilic microalga *Galdieria sulphuraria*. *Russian Journal of Plant Physiology*. 53, 153-162.
- Sirisansaneeyakul, S., Singhasuwan, S., Choorit, W., Phoopat, N., Garcia, J.L., Chisti, Y., 2011. Photoautotrophic production of lipids by some *Chlorella* strains. *Marine Biotechnology*. 13, 928-941.
- Skjånes, K., Lindblad, P., Muller, J., 2007. BioCO<sub>2</sub> - A multidisciplinary, biological approach using solar energy to capture CO<sub>2</sub> while producing H<sub>2</sub> and high value products. *Biomolecular Engineering*. 24, 405-413.



- Soanen, N., Da Silva, E., Gardarin, C., Michaud, P., Laroche, C., 2016. Improvement of exopolysaccharide production by *Porphyridium marinum*. *Bioresource Technology*. 213, 231-238.
- Sobczuk, T.M., Camacho, F.G., Grima, E.M., Chisti, Y., 2005. Effects of agitation on the microalgae *Phaeodactylum tricornutum* and *Porphyridium cruentum*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 28, 243-250.
- Sonani, R.R., Singh, N.K., Kumar, J., Thakar, D., Madamwar, D., 2014. Concurrent purification and antioxidant activity of phycobiliproteins from *Lyngbya* sp. A09DM: an antioxidant and anti-aging potential of phycoerythrin in *Caenorhabditis elegans*. *Process Biochemistry*. 49, 1757-1766.
- Spalding, M.H., Critchley, C., Govindjee, Orgren, W.L., 1984. Influence of carbon dioxide concentration during growth on fluorescence induction characteristics of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynthesis Research*. 5, 169-176.
- Staats, N., Winder, B.D., Stal, L.J., Mur, L.R., 1999. Isolation and characterization of extracellular polysaccharides from the epipelagic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Navicula salinarum*. *European Journal of Phycology*. 34, 161-169.
- Stahelin, L.A., Pickett-Heaps, J.D., 1975. The ultrastructure of *Scenedesmus* (Chlorophyceae). I. Species with the “reticulate” or “warty” type of ornamental layer. *Journal of Phycology*. 11, 163-185.
- Stenesh, J., 1989. *Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*. 2<sup>nd</sup> edition. John Wiley & Sons, New York.
- Størseth, T.R., Hansen, K., Reitan, K.I., Skjermo, J., 2005. Structural characterization of  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 3)-glucans from different growth phases of the marine diatoms *Chaetoceros mülleri* and *Thalassiosira weissflogii*. *Carbohydrate Research*. 340, 1159-1164.
- Størseth, T.R., Kirkvold, S., Skjermo, J., Reitan, K.I., 2006. A branched  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 6)-glucan from the marine diatom *Chaetoceros debilis* (Bacillariophyceae) characterized by NMR. *Carbohydrate Research*. 341, 2108-2114.

- Suárez, E.R., Kralovec, J.A., Nosedá, M.D., Ewart, H.S., Barrow, C.J., Lumsden, M.D., Grindley, T.B., 2005. Isolation, characterization and structural determination of a unique type of arabinogalactan from an immunostimulatory extract of *Chlorella pyrenoidosa*. *Carbohydrate Research*. 340, 1489-1498.
- Sudo, H., Burgess, J.G., Takemasa, H., Nakamura, N., Matsunaga, T., 1995. Sulfated exopolysaccharide production by the halophilic cyanobacterium *Aphanocapsa halophytia*. *Current Microbiology*. 30, 219-222.
- Sugimoto, I., Onimatsu, H., Fujie, M., Usami, S., Yamada, T., 2004. vAL-1, a novel polysaccharide lyase encoded by chlorovirus CVK2. *FEBS Letters*. 559, 51-56.
- Sun, L., Wang, C., Shi, Q., Ma, C., 2009. Preparation of different molecular weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum* and their antioxidant activities. *International Journal of Biological Macromolecules*. 45, 42-47.
- Sun, L., Wang, L., Zhou, Y., 2012. Immunomodulation and antitumor activities of different-molecular-weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum*. *Carbohydrate Polymers*. 87, 1206-1210.
- Sun, Y., Wang, C., 2009. The optimal growth conditions for the biomass production of *Isochrysis galbana* and the effects that phosphorus,  $Zn^{2+}$ ,  $CO_2$ , and light intensity have on the biochemical composition of *Isochrysis galbana* and the activity of extracellular CA. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 14, 225-231.
- Sung, K.D., Lee, J.S., Shin, C.S., Park, S.C., 1999. Isolation of a new highly  $CO_2$  tolerant fresh water microalga *Chlorella* sp. KR-1. *Renewable Energy*. 16, 1019-1022.
- Sushchik, N.N., Kalacheva, G.S., Zhila, N.O., Gladyshev, M.I., Volova, T.G., 2003. A temperature dependence of the intra- and extracellular fatty-acid composition of green algae and cyanobacterium. *Russian Journal of Plant Physiology*. 50, 374-380.
- Sym, S.D., Maneveldt, G., 2011. *Chromista*. John Wiley & Sons, Chichester.

## T

---

Takeda, H., 1991. Sugar composition of the cell wall and the taxonomy of *Chlorella* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*. 27, 224-232.

Takeda, H., 1996. Cell wall sugars of some *Scenedesmus* species. *Phytochemistry*. 42, 673-675.

Takeda, H., Hirokawa, T., 1978. Studies on the cell wall of *Chlorella* I. Quantitative changes in cell wall polysaccharides during the cell cycle of *Chlorella ellipsoidea*. *Plant and Cell Physiology*. 19, 591-598.

Takeda, H., Hirokawa, T., 1984. Studies on the cell wall of *Chlorella* V. Comparison of the cell wall chemical compositions in strains of *Chlorella ellipsoidea*. *Plant and Cell Physiology*. 25, 287-295.

Talyshinsky, M.M., Souprun, Y.Y., Huleihel, M.M., 2002. Anti-viral activity of red microalgal polysaccharides against retroviruses. *Cancer Cell International*. 2, 8.

Tang, D., Han, W., Li, P., Miao, X., Zhong, J., 2011. CO<sub>2</sub> biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO<sub>2</sub> levels. *Bioresource Technology*. 102, 3071-3076.

Tannin-Spitz, T., Bergman, M., van-Moppes, D., Grossman, S., Arad, S.M., 2005. Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalga *Porphyridium* sp. *Journal of Applied Phycology*. 17, 215-222.

Tease, B., Jürgens, U.J., Golecki, J.R., Heinrich, U.R., Rippka, R., Weckesser, J., 1991. Fine-structural and chemical analyses on inner and outer sheath of the cyanobacterium *Gloeotheca* sp. PCC 6909. *Antonie van Leeuwenhoek*. 59, 27-34.

Terauchi, A.M., Peers, G., Kobayashi, M.C., Niyogi, K.K., Merchant, S.S., 2010. Trophic status of *Chlamydomonas reinhardtii* influences the impact of iron deficiency on photosynthesis. *Photosynthesis Research*. 105, 39-49.

- Tischer, R.G., Davis, E.B., 1971. The effect of various nitrogen sources upon the production of extracellular polysaccharide by the blue-green alga *Anabaena flos-aquae* A-37. *Journal of Experimental Botany*. 22, 546-551.
- Tischer, R.G., Moore, B.G., 1964. An extracellular polysaccharide produced by *Palmella mucosa* Kütz. *Archiv für Mikrobiologie*. 49, 158-166.
- Tomar, S., Adaganti, S.Y., 2013. Production of ethanol using *Calliandra* shrub by hydrothermal pretreatment method. *International Journal of Current Engineering and Technology*. 3, 1921-1924.
- Tomitani, A., Knoll, A.H., Cavanaugh, C.M., Ohno, T., 2006. The evolutionary diversification of Cyanobacteria: molecular–phylogenetic and paleontological perspectives. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103, 5442-5447.
- Tousignant, M.É., Delorme, M., 2006. *Connaître le fonctionnement de la plante pour mieux gérer son environnement*. Québec Vert. 3.
- Trabelsi, L., Ben Ouada, H., Bacha, H., Ghoul, M., 2009a. Combined effect of temperature and light intensity on growth and extracellular polymeric substance production by the cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *Journal of Applied Phycology*. 21, 405-412.
- Trabelsi, L., M'sakni, N.H., Ben Ouada, H., Bacha, H., Roudesli, S., 2009b. Partial characterization of extracellular polysaccharides produced by cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 14, 27-31.
- Tragin, M., Lopes dos Santos, A., Christen, R., Vault, D., 2016. Diversity and ecology of green microalgae in marine systems: an overview based on 18S rRNA gene sequences. *Perspectives in Phycology*. 3, 141-154.
- Tran, K.C., Mendoza Martin, J.L., Heaven, S., Banks, C.J., Acien Fernandez, F.G., Molina Grima, E., 2014. Cultivation and anaerobic digestion of *Scenedesmus* spp. grown in a pilot-scale open raceway. *Algal Research*. 5, 95-102.
- Turner, J.S., Brittain, E.G., 1962. Oxygen as a factor in photosynthesis. *Biological Reviews*. 37, 130-170.

## U

---

Underwood, G.J.C., Boulcott, M., Raines, C.A., Waldron, K., 2004. Environmental effects on exopolymer production by marine benthic diatoms: dynamics, changes in composition, and pathways of production. *Journal of Phycology*. 40, 293-304.

Urbani, R., Magaletti, E., Sist, P., Cicero, A.M., 2005. Extracellular carbohydrates released by the marine diatoms *Cylindrotheca closterium*, *Thalassiosira pseudonana* and *Skeletonema costatum*: effect of P-depletion and growth status. *Science of The Total Environment*. 353, 300-306.

Urbani, R., Sist, P., Pletikapic, G., Misic, T., Svetlicic, V., Zutic, V., 2012. Diatom polysaccharides: extracellular production, isolation and molecular characterization. *In: The Complex World of Polysaccharides*. Karunaratne, D.N. (Eds.). 345-369.

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*. *Bioresource Technology*. 157, 134-139.

## V

---

Varela, D.E., Willers, V., Crawford, D.W., 2011. Effect of zinc availability on growth, morphology, and nutrient incorporation in a coastal and an oceanic diatom. *Journal of Phycology*. 47, 302-312.

Vega-Estrada, J., Montes-Horcasitas, M.C., Domínguez-Bocanegra, A.R., Cañizares-Villanueva, R.O., 2005. *Haematococcus pluvialis* cultivation in split-cylinder internal-loop airlift photobioreactor under aeration conditions avoiding cell damage. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 68, 31-35.

Vidyashankar, S., Deviprasad, K., Chauhan, V.S., Ravishankar, G.A., Sarada, R., 2013. Selection and evaluation of CO<sub>2</sub> tolerant indigenous microalga *Scenedesmus dimorphus* for unsaturated fatty acid rich lipid production under different culture conditions. *Bioresource Technology*. 144, 28-37.

Vieira, A.A.H., Paulsen, B.S., 1994. Studies on the composition of extracellular polysaccharide produced by *Hyalotheca dissiliens* (Desmidiaceae). *Biologia Bratislava*. 49, 535-539.

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*. *Bioresource Technology*. 146, 732-735.

Vincenzini, M., De Philippis, R., Sili, C., Materassi, R., 1990. Studies on exopolysaccharide release by diazotrophic batch cultures of *Cyanospira capsulata*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 34, 392-396.

Vincenzini, M., De Philippis, R., Sili, C., Materassi, R., 1993. Stability of molecular and rheological properties of the exopolysaccharide produced by *Cyanospira capsulata* cultivated under different growth conditions. *Journal of Applied Phycology*. 5, 539-541.

Volk, R.B., Venzke, K., Blaschek, W., 2006. Structural investigation of a polysaccharide released by the cyanobacterium *Nostoc insulare*. *Journal of Applied Phycology*. 19, 255-262.

## W

---

Wahidin, S., Idris, A., Shaleh, S.R.M., 2013. The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. *Bioresource Technology*. 129, 7-11.

Wan, C., Bai, F.W., Zhao, X.Q., 2013. Effects of nitrogen concentration and media replacement on cell growth and lipid production of oleaginous marine microalga *Nannochloropsis oceanica* DUT01. *Biochemical Engineering Journal*. 78, 32-38.

Wan, M., Jin, X., Xia, J., Rosenberg, J.N., Yu, G., Nie, Z., Oyler, G.A., Betenbaugh, M.J., 2014. The effect of iron on growth, lipid accumulation, and gene expression profile of the freshwater microalga *Chlorella sorokiniana*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98, 9473-9481.

Wang, S.T., Pan, Y.Y., Liu, C.C., Chuang, L.T., Nathan, C.N., 2011. Characterization of a green microalga UTEX 2219-4: effects of photosynthesis and osmotic stress on oil body formation. *Botanical Studies*. 52, 305-312.

- Wang, L., Li, Y., Sommerfeld, M., Hu, Q., 2013. A flexible culture process for production of the green microalga *Scenedesmus dimorphus* rich in protein, carbohydrate or lipid. *Bioresource Technology*. 129, 289-295.
- Wang, J., Yang, H., Wang, F., 2014. Mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production: status and prospects. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 172, 3307-3329.
- Weiss, T.L., Roth, R., Goodson, C., Vitha, S., Black, I., Azadi, P., Rusch, J., Holzenburg, A., Devarenne, T.P., Goodenough, U., 2012. Colony organization in the green alga *Botryococcus braunii* (race B) is specified by a complex extracellular matrix. *Eukaryotic Cell*. 11, 1424-1440.
- Wen, Z.Y., Chen, F., 2001. A perfusion-cell bleeding culture strategy for enhancing the productivity of eicosapentaenoic acid by *Nitzschia laevis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57, 316-322.
- Worden, A.Z., Follows, M.J., Giovannoni, S.J., Wilken, S., Zimmerman, A.E., Keeling, P.J., 2015. Rethinking the marine carbon cycle: factoring in the multifarious lifestyles of microbes. *Science*. 347, 1257594.
- Wu, N., Li, Y., Lan, C.Q., 2011. Production and rheological studies of microalgal extracellular biopolymer from lactose using the green alga *Neochloris oleoabundans*. *Journal of Polymers and the Environment*. 19, 935-942.
- Wu, L.F., Chen, P.C., Lee, C.M., 2013. The effects of nitrogen sources and temperature on cell growth and lipid accumulation of microalgae. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 85, 506-510.
- Wu, Y.H., Yu, Y., Li, X., Hu, H.Y., Su, Z.F., 2012. Biomass production of a *Scenedesmus* sp. under phosphorous-starvation cultivation condition. *Bioresource Technology*. 112, 193-198.
- Wykoff, D.D., Davies, J.P., Melis, A., Grossman, A.R., 1998. The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*. 117, 129-139.

## X

---

Xhaufaire-Uhoda, E., Fontaine, K., Piérard, G.E., 2008. Kinetics of moisturizing and firming effects of cosmetic formulations. *International Journal of Cosmetic Science*. 30, 131-138.

Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., Jia, Y., 2010a. Growth and nutrient removal properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. LX1 under different kinds of nitrogen sources. *Ecological Engineering*. 36, 379-381.

Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., Ying-xue, S., 2010b. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*. 101, 5494-5500.

Xin, L., Hong-ying, H., Yu-ping, Z., 2011. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. *Bioresource Technology*. 102, 3098-3102.

Xu, H., Miao, X., Wu, Q., 2006. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*. 126, 499-507.

## Y

---

Yang, J., Li, X., Hu, H., Zhang, X., Yu, Y., Chen, Y., 2011. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga, *Chlorella ellipsoidea* YJ1, in domestic secondary effluents. *Applied Energy*. 88, 3295-3299.

Yang, L., Chen, J., Qin, S., Zeng, M., Jiang, Y., Hu, L., Xiao, P., Hao, W., Hu, Z., Lei, A., Wang, J., 2018. Growth and lipid accumulation by different nutrients in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology for Biofuels*. 11, 1-12.

Yang, Y., Gao, K., 2003. Effects of CO<sub>2</sub> concentrations on the freshwater microalgae, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology*. 15, 379-389.

Yanhui C., 2017. Cosmetic composition with functions of repairing and strengthening skin barrier and application. Patent CN107412042A.



- Yao, C., Ai, J., Cao, X., Xue, S., Zhang, W., 2012. Enhancing starch production of a marine green microalga *Tetraselmis subcordiformis* through nutrient limitation. *Bioresource Technology*. 118, 438-444.
- Yao, C., Jiang, J., Cao, X., Liu, Y., Xue, S., Zhang, Y., 2018. Phosphorus enhances photosynthetic storage starch production in a green microalga (Chlorophyta) *Tetraselmis subcordiformis* in nitrogen starvation conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 66, 10777-10787.
- Ye, Y., Clech, P.L., Chen, V., Fane, A.G., 2005. Evolution of fouling during crossflow filtration of model EPS solutions. *Journal of Membrane Science*. 264, 190-199.
- Yim, J.H., Kim, S.J., Ahn, S.H., Lee, H.K., 2003. Optimal conditions for the production of sulfated polysaccharide by marine microalga *Gyrodinium impudicum* strain KG03. *Biomolecular Engineering*. 20, 273-280.
- Yim, J.H., Son, E., Pyo, S., Lee, H.K., 2005. Novel sulfated polysaccharide derived from red-tide microalga *Gyrodinium impudicum* strain KG03 with immunostimulating activity in vivo. *Marine Biotechnology*. 7, 331-338.
- Yoon, H.S., Müller, K.M., Sheath, R.G., Ott, F.D., Bhattacharya, D., 2006. Defining the major lineages of red algae (Rhodophyta). *Journal of Phycology*. 42, 482-492.
- Yoon, H.S., Nelson, W., Lindstrom, S.C., Boo, S.M., Poeschel, C., Qiu, H., Bhattacharya, D., 2017. Rhodophyta. *In: Handbook of the Protists*. Archibald, J.M., Simpson, A.G.B., Slamovits, C.H. (Eds.). 2, 89-133.
- You, T., Barnett, S.M., 2004. Effect of light quality on production of extracellular polysaccharides and growth rate of *Porphyridium cruentum*. *Biochemical Engineering Journal*. 19, 251-258.
- Yu, S., Blennow, A., Bojko, M., Madsen, F., Olsen, C.E., Engelsen, S.B., 2002. Physico-chemical characterization of floridean starch of red algae. *Starch/Stärke*. 54, 66-74.
- Yue, L., Chen, W., 2005. Isolation and determination of cultural characteristics of a new highly CO<sub>2</sub> tolerant fresh water microalgae. *Energy Conversion and Management*. 46, 1868-1876.

## Z

---

Zemke, P., 2010. Mathematical modeling of light utilization and the effects of temperature cycles on productivity in a steady-state algal photobioreactor. Thèse de Doctorat, Mechanical Engineering, Utah State University.

Zerrouh, O., Reinoso-Moreno, J.V., López-Rosales, L., Cerón-García, M.D.C., Sánchez-Mirón, A., García-Camacho, F., Molina-Grima, E., 2017. Biofouling in photobioreactors for marine microalgae. *Critical Reviews in Biotechnology*. 37, 1006-1023.

Zhang, S., Xu, C., Santschi, P.H., 2008a. Chemical composition and <sup>234</sup>Th (IV) binding of extracellular polymeric substances (EPS) produced by the marine diatom *Amphora* sp. *Marine Chemistry*. 112, 81-92.

Zhang, G., Ji, S., Gao, X., Liu, Z., 2008b. Adsorptive fouling of extracellular polymeric substances with polymeric ultrafiltration membranes. *Journal of Membrane Science*. 309, 28-35.

Zhang, Z., Volkman, J.K., 2017. Algaenan structure in the microalga *Nannochloropsis oculata* characterized from stepwise pyrolysis. *Organic Geochemistry*. 104, 1-7.

Zhao, L.S., Li, K., Wang, Q.-M., Song, X.Y., Su, H.N., Xie, B.B., Zhang, X.Y., Huang, F., Chen, X.L., Zhou, B.C., Zhang, Y.Z., 2017. Nitrogen starvation impacts the photosynthetic performance of *Porphyridium cruentum* as revealed by chlorophyll a fluorescence. *Scientific Reports*. 7, 1-11.

Zijffers, J.W.F., Schippers, K.J., Zheng, K., Janssen, M., Tramper, J., Wijffels, R.H., 2010. Maximum photosynthetic yield of green microalgae in photobioreactors. *Marine Biotechnology*. 12, 708-718.

Zimm, B.H., 1948. The Scattering of Light and the Radial Distribution Function of High Polymer Solutions. *J. Chem. Phys.* 16, 1093–1099.

Zucchi, M.R., Necchi, O., 2001. Effects of temperature, irradiance and photoperiod on growth and pigment content in some freshwater red algae in culture. *Phycological Research*. 49, 103-114.




# Annexe 1


**Publication :** Gaignard, C., Macao, V., Gardarin, C., Rihouey, C., Picton, L., Michaud, P., Laroche, C., 2018. The red microalga *Flintiella sanguinaria* as a new exopolysaccharide producer. *Journal of Applied Phycology*. 30, 2803-2814.

Journal of Applied Phycology  
https://doi.org/10.1007/s10811-018-1389-2

6TH CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR APPLIED PHYCOLOGY

 CrossMark

## The red microalga *Flintiella sanguinaria* as a new exopolysaccharide producer

Clément Gaignard<sup>1</sup> · Vanessa Macao<sup>1</sup> · Christine Gardarin<sup>1</sup> · Christophe Rihouey<sup>2</sup> · Luc Picton<sup>2</sup> · Philippe Michaud<sup>1</sup> · Céline Laroche<sup>1</sup> 

Received: 27 July 2017 / Revised and accepted: 2 January 2018  
© Springer Science+Business Media B.V., part of Springer Nature 2018


**Abstract**  
*Flintiella sanguinaria* is a red unicellular microalgae belonging to Porphyridiophyceae with a high potential as an exopolysaccharide producer. A new culture medium was developed by a stoichiometry approach based on elemental analysis of microalgae, and culture conditions were improved after measurements of photosynthetic activity as a function of irradiance, temperature and pH. These optimal conditions were thus validated in a photobioreactor for the production of biomass and exopolysaccharide (EPS). After extraction and purification of the EPS, it was characterised by HPAEC-PAD, HPLC and FT-IR as a methylated and acetylated galactoxylan including a significant amount of rhamnose and glucuronic acid in its structure. Macromolecular conformation in dilute solution of native, deproteinised and desubstituted EPS from *F. sanguinaria* revealed that this polysaccharide had a strong associative behaviour in which hydrophobic interactions or hydrogen bonding but also proteins were implicated.

**Keywords** *Flintiella* · Rhodophyta · Exopolysaccharide · Culture · Characterisation

### Introduction


Microalgae are unicellular photosynthetic microorganisms used for many years for their capacities to produce biomass and high value compounds such as pigments, polyunsaturated fatty acids (PUFAs), lipids and polysaccharides (Borowitzka 2013; Chew et al. 2017). Polysaccharides are biomolecules present in all living organisms where they have numerous and different physiological functions including energy storage, structure, extracellular matrix, biofilm formation, cellular communication and others. These macromolecules are linear or ramified polymers of monosaccharides (mainly pentoses and hexoses) linked by glycosidic linkages. Considering the large variety of monosaccharides and isomers in nature (up to 50) and their ability to be linked to each other by numerous glycosidic bonds (up to 5 combinations for two hexoses), the theoretical variability of these structures is unlimited. This variability is reinforced by the association of polysaccharides with non-sugar groups such as proteins and sulphates for example. Polysaccharides produced by microalgae and cyanobacteria can be divided into several groups, with some of them having ambiguities in their denomination in the literature. They can be fibrillar polysaccharides from cell walls, storage glucans such as starch or chrysolaminarin for diatoms, exocellular polysaccharides associated or not with cellular membranes, etc. Exopolysaccharides (EPS) including released polysaccharides have been the more studied in the literature considering their potential as hydrocolloids or biological agents even if their production costs are more expensive than those from fungi, macroalgae and terrestrial plants (for a review, see Guzmán et al. 2003; Majdoub et al. 2009; Chen et al. 2010, 2016; Roussel et al. 2015; Delattre et al. 2016; Park et al. 2017). In this context, many studies have investigated the structures of EPS produced by different genera and species of microalgae and correlate them with techno-functional properties and/or biological activities (Delattre et al. 2016). Among these studies, sulphated polysaccharides from *Rhodella* and *Porphyridium* species, two genera of the red marine microalgae belonging to Rhodophyta, are the most abundant even if it was revealed that the complexity of these

---

 Céline Laroche  
celine.laroche@uca.fr

<sup>1</sup> Université Clermont Auvergne, CNRS, Institut Pascal, 63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>2</sup> UNIROUEN, INSA Rouen, CNRS, PBS, Normandie Univ, 76000 Rouen, France

Published online: 02 February 2018  Springer

## Annexe 2

**Publication** : Gaignard, C., Gargouch, N., Dubessay, P., Delattre, C., Pierre, G., Laroche, C., Fendri, I., Abdelkafi, S., Michaud, P., 2019. New horizons in culture and valorization of red microalgae. *Biotechnology Advances*. 37, 193-222.

Biotechnology Advances 37 (2019) 193–222

---



Contents lists available at ScienceDirect

### Biotechnology Advances

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biotechadv](http://www.elsevier.com/locate/biotechadv)



---

Research review paper

## New horizons in culture and valorization of red microalgae

Clement Gaignard<sup>a,1</sup>, Nesrine Gargouch<sup>a,b,1</sup>, Pascal Dubessay<sup>a</sup>, Cedric Delattre<sup>a</sup>,  
Guillaume Pierre<sup>a</sup>, Celine Laroche<sup>a</sup>, Imen Fendri<sup>b</sup>, Slim Abdelkafi<sup>c</sup>, Philippe Michaud<sup>a,\*</sup>



<sup>a</sup> CNRS, SIGMA Clermont, Institut Pascal, Université Clermont Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand, France  
<sup>b</sup> Laboratoire de Biotechnologies Végétales appliquées à l'amélioration des cultures, Life Sciences Department, Faculty of Sciences of Sfax, University of Sfax, Sfax, Tunisia  
<sup>c</sup> Unité de Biotechnologie des Algues, Biological Engineering Department, National School of Engineers of Sfax, University of Sfax, Sfax, Tunisia

---

**ARTICLE INFO**

**Keywords:**  
Red microalgae  
Polysaccharides  
Pigments  
Porphyridium  
Rhodella

**ABSTRACT**

Research on marine microalgae has been abundantly published and patented these last years leading to the production and/or the characterization of some biomolecules such as pigments, proteins, enzymes, biofuels, polyunsaturated fatty acids, enzymes and hydrocolloids. This literature focusing on metabolic pathways, structural characterization of biomolecules, taxonomy, optimization of culture conditions, biorefinery and downstream process is often optimistic considering the valorization of these biocompounds. However, the accumulation of knowledge associated with the development of processes and technologies for biomass production and its treatment has sometimes led to success in the commercial arena. In the history of the microalgae market, red marine microalgae are well positioned particularly for applications in the field of high value pigment and hydrocolloid productions. This review aims to establish the state of the art of the diversity of red marine microalgae, the advances in characterization of their metabolites and the developments of bioprocesses to produce this biomass.

---

### 1. Introduction

Microalgae constitute a diverse group of eukaryote photoautotrophic single cell-organisms present in many ecosystems including terrestrial, aquatic and airborne environments (Flechtner, 2007; Rajvanshi and Sharma, 2012; Tesson et al., 2016; William and Laurens, 2010). They are able to live in harsh conditions (Lewis and Flechtner, 2002; Pushkareva et al., 2016) and use solar energy, water, and inorganic nutrients to reduce CO<sub>2</sub> into complex organic compounds. Some of them have also the ability to use some organic carbon dividing their metabolism into three types: photoautotrophic, heterotrophic and

mixotrophic even if they are mainly photoautotrophic organisms. Their systemic classification is based on their pigment composition leading to nine classes in which the main groups are Phaeophyceae, Chlorophyceae, Pyrrophyceae, Bacillariophyceae, Chrysophyceae and Rhodophyceae or red microalgae. It has been estimated that about 200,000–800,000 species exist (including Cyanobacteria) of which 50,000 species are described (Guiry, 2012; Richmond, 2004; Norton et al., 1996). The large diversity of microalgae species is correlated with a large variety of enzymes and metabolites including amino acids, peptides, proteins, carbohydrates (notably complex poly- and oligosaccharides), polyunsaturated fatty acids (PUFAs), carotenoids, sterols,

---


**Abbreviations:** AA, Arachidonic acid; ACP, Acyl-transporter-protein; APC, Allophycocyanin; ATP, Adenosine triphosphate; B-PE, B-Phycocerythrin; BPS, Bound polysaccharide; CA, Carbonic anhydrase; CCM, CO<sub>2</sub> concentrating mechanism; Chl a, Chlorophyll a; Chl b, Chlorophyll b; Chl c, Chlorophyll c; Chl d, Chlorophyll d; Ci, Inorganic carbon; C-PC, C-Phycocyanin; C-PE, C-Phycocerythrin; DHA, Docosahexaenoic acid; DNA, Deoxyribonucleic acid; DW, Dry weight; EMP, Embden-Meyerhof pathway; EPA, Eicosapentaenoic acid; FACS, Fluorescence-activated cell sorting; FRET, Fluorescence resonance energy transfer; Gc, Compensation irradiance; GLA,  $\gamma$ -linolenic acid; GOGAT, Glutamate synthase; GS, Glutamine synthetase; Gs, Saturation point; IPS, Intracellular polysaccharide; Ma, Million years ago; MW, Molecular weight; MWCO, Molecular weight cut off; NADH, Nicotinamide adenine dinucleotide; NADPH, Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; Ni, Nitrite reductase; NR, Nitrate reductase; PAR, Photosynthetic active radiation; PBR, Photobioreactor; PC, Phycocyanin; PE, Phycocerythrin; PEC, Phycocerythrocyanin; PES, Polyethersulfone; PEG, poly(ethylene glycol); PFD, Photon flux density; PPP, Pentose phosphate pathway; PS, Polysaccharide; PUFA, Polyunsaturated fatty acid; PVC, Polyvinyl chloride; q<sub>0</sub>, incident light flux; RNA, Ribonucleic acid; R-PC, R-Phycocyanin; R-PE, R-Phycocerythrin; RPS, Released polysaccharide; RuBisCo, Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase; sPS, Sulphated polysaccharide; TAG, Triacylglyceride; TCA, Tricarboxylic acid; TUF, Tangential ultrafiltration; VLDL, Very low density lipoprotein

\* Corresponding author.  
E-mail address: [philippe.michaud@uca.fr](mailto:philippe.michaud@uca.fr) (P. Michaud).  
<sup>1</sup> C. Gaignard and N. Gargouch contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.014>  
Received 18 May 2018; Received in revised form 26 November 2018; Accepted 26 November 2018  
Available online 28 November 2018  
0734-9750/© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

# Annexe 3

**Poster :** Gaignard, C., Pierre, G., Delattre, C., Dubessay, P., Probert, I., Michaud, P., Laroche, C. Identification of a new EPS producer: *Glossomastix* sp. The 7<sup>th</sup> International Forum on Industrial Bioprocesses (IFIBiop), Wuxi, Chine (2017). Prix du meilleur poster.



## Identification of a new EPS producer: *Glossomastix* sp.

Gaignard C.<sup>1</sup>, Pierre G.<sup>1</sup>, Delattre C.<sup>1</sup>, Dubessay P.<sup>1</sup>, Probert I.<sup>2</sup>, Michaud P.<sup>1\*</sup>, Laroche C.<sup>1</sup>

(1) Université Clermont Auvergne, CNRS, Institut Pascal, F-63000 Clermont Ferrand, 2 avenue Blaise Pascal, 63170 Aubière, France  
 (2) Station Biologique de Roscoff (SBR), FR2424, Université Pierre et Marie Curie (Paris 6), CNRS, Place Georges Teissier, 29680 Roscoff, France  
 \* philippe.michaud@uca.fr

Microalgae are unicellular photosynthetic microorganisms currently exploited by industry for their capacity to produce high-value products such as pigments, polyunsaturated fatty acids, lipids and polysaccharides. Exopolysaccharide (EPS) are high molecular weight biopolymers of monosaccharides linked by glycosidic bonds. The enthusiasm for microalgae and cyanobacteria EPS is currently increasing as they have original structures coupled with diverse rheological properties and/or biological activities including anti-parasitic, immunomodulatory, anti-bacterial, anti-cancer, anti-inflammatory, anti-oxidative and anti-coagulant activities.

### The Pinguiophyceae

The golden algal class, Pinguiophyceae, is a monophyletic group including five genus (Figures 1 and 2) and characterized by :

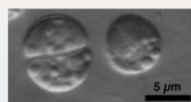
- High concentrations of polyunsaturated fatty acids, especially 20:5 (eicosapentaenoic acid, EPA)
- Fucoxanthin, violaxanthin, zeaxanthin and  $\beta$ -carotene as major carotenoid pigments
- Chlorophylls a and c

**EPS production by strains of this genus was not yet been observed**

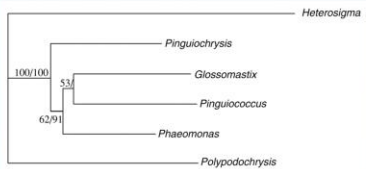
### Growth and EPS production

- Strain: *Glossomastix* sp. (RCC 3688) from Roscoff Culture Collection
- Batch mode in a 5 L photobioreactor (PBR)
- Modified f/2 medium (enriched with N and P) with artificial sea water
- 20 °C, pH 8 maintained by sterile Air/CO<sub>2</sub> injected, controlled irradiance

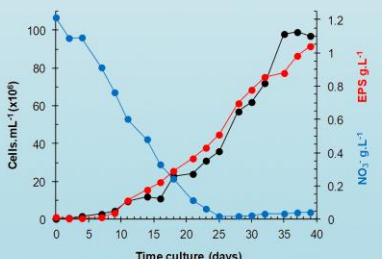
The figure 3 shows the growth coupled with nitrates consumption. EPS production started at day 9 and increased all along up to 1.04 g.L<sup>-1</sup> at day 39



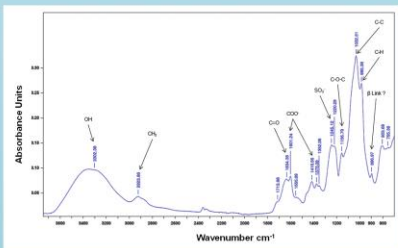
**Figure 1:** *Glossomastix chrysoplata* (Charles J. O'Kelly, *Phycological Research* 2002; 50:67-74)




**Figure 2:** Neighbor-joining tree produced by combined analysis of the 18S rRNA and *rbcL* genes sequence (*Heterosigma* as the outgroup) (Kawashi et al., *Phycological Research* 2002; 50: 31–47)




**Figure 3:** Growth, nitrates consumption and EPS production during *Glossomastix* culture in PBR



**Figure 7:** FTIR spectrum of *Glossomastix* EPS



**Figure 4:** Supernatant from *Glossomastix* culture



**Figure 5:** *Glossomastix* culture in PBR

### EPS characterization

➢ Characterization of the purified EPS after desalting and freeze-drying (purity 86 % determined by GC-MS)

Component	Colorimetric assays (a)	Monosaccharides composition by GC-MS (b)
Total sugars	69.9 %	2.6%
Neutral sugars	64.3 %	0.7%
Uronic acids	15.0 %	12.2%
Sulfate groups	8.9 %	22.8%
Protein	7.7 %	54.1%

- Xylose
- Galactose
- Glucose
- Glucuronic acid
- Arabinose
- Rhamnose

### Further investigations

This study firstly reported the production of EPS by the genus *Glossomastix*. A high viscosity has been observed during PBR experiment suggesting a potential as hydrocolloid. Exopolysaccharide extracts are currently investigated for biological activities and rheological properties and further investigations are in progress to resolve the biochemical structure.

This work was sponsored by the French Research Agency (ANR) through the POLYSALGUE project, reference ANR-15-CE21-0013



## Résumé

Le principal objectif de cette thèse était d'améliorer les connaissances sur la capacité des microalgues et Cyanobactéries à produire des Exopolysaccharides (EPS). Le criblage effectué sur 166 souches de la Roscoff Culture Collection (RCC) a permis d'identifier 45 nouvelles souches potentiellement productrices d'EPS. Des études biochimiques par Chromatographie Echangeuse d'Anions Haute Performance couplée à un Détecteur Ampérométrique Pulsé (CEAHP-DAP), et par Chromatographie Phase Gaz couplée à de la Spectrométrie de Masse (CPG/SM) ont confirmé la nature polysaccharidique de 20 nouveaux polymères identifiés. Au cours de ce travail, des cultures en Photobioréacteur (PBR) 1,4 et 5 L ont été menées sur quelques souches et de caractériser au plus fin leur EPS (compositions biochimiques et caractéristiques physico-chimiques). Cela a conduit, en outre, à l'identification d'un hétéroxylane issu d'une microalgue *Glossomastix*. Cet EPS est constitué d'une chaîne principale de  $\beta$ -(1,3)- et  $\beta$ -(1,4)-D-Xylp substituée en positions O-2 et O-3 par diverses chaînes et/ou résidus terminaux tels que D-Xylp-(1→6)-D-Galp, D-Xylp-(1→4)-D-Galp, D-Xylp-(1→3)-D-Galp, Galp-(1→, SF-Xylp-(1→, Xylp-(1→ et Glcp-(1→. Enfin, des analyses statistiques réalisées sur 81 compositions en monosaccharides d'EPS de microalgues ont permis pour la première fois d'établir un lien entre la composition biochimique et l'appartenance phylogénétique des microalgues.

**Mots clés :** Criblage, Microalgue, Cyanobactérie, Exopolysaccharide, Phylogénie.

## Abstract

The main objective of this thesis was to improve knowledge on the capacity of microalgae and Cyanobacteria to produce Exopolysaccharides (EPS). Screening carried out on 166 strains from the Roscoff Culture Collection (RCC) made it possible to identify 45 new potentially EPS producers. Biochemical studies using High Performance Anion Exchange Chromatography with a Pulsed Amperometric Detector (HPAEC-PAD), and Gas Chromatography with Mass Spectrometry (GC/MS) confirmed the polysaccharide nature of 20 new identified polymers. During this work, cultures in 1,4 and 5 L Photobioreactors (PBR) were performed on few strains in order to characterize at best their EPS (biochemical compositions and physicochemical characteristics). This work led, in addition, to the identification of a heteroxylan from the microalga *Glossomastix*. Its EPS consists of a main chain of  $\beta$ -(1,3)- and  $\beta$ -(1,4)-D-Xylp substituted in O-2 and O-3 positions by various chains and/or terminal residues such as D-Xylp-(1→6)-D-Galp, D-Xylp-(1→4)-D-Galp, D-Xylp-(1→3)-D-Galp, Galp-(1→, SF-Xylp-(1→, Xylp-(1→ et Glcp-(1→. Finally statistical analyzes carried out on 81 monosaccharide compositions of microalgae EPS made it possible for the first time to establish a link between biochemical composition and phylogenetic membership of microalgae.

**Keywords:** Screening, Microalgae, Cyanobacteria, Exopolysaccharide, Phylogeny.