



HAL
open science

Amélioration des conditions de bioproduction et d'extraction des caroténoïdes à partir des microalgues psychrophiles : *sphaerocystis* sp. et *Pleurastrum* sp.

Adila Gherabli

► To cite this version:

Adila Gherabli. Amélioration des conditions de bioproduction et d'extraction des caroténoïdes à partir des microalgues psychrophiles : *sphaerocystis* sp. et *Pleurastrum* sp.. Génie des procédés. Université de Technologie de Compiègne, 2024. Français. NNT : 2024COMP2814 . tel-04861650

HAL Id: tel-04861650

<https://theses.hal.science/tel-04861650v1>

Submitted on 2 Jan 2025

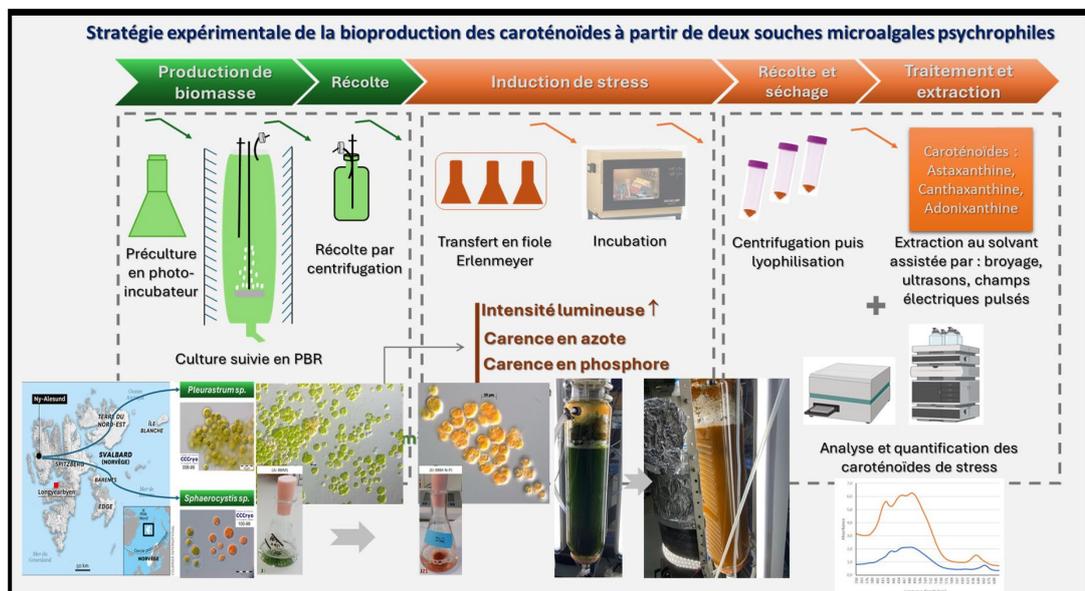
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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.

Par **Adila GHERABLI**

Amélioration des conditions de bioproduction et d'extraction des caroténoïdes à partir des microalgues psychrophiles : Sphaerocystis sp. et Pleurastrum sp.

Thèse présentée
pour l'obtention du grade
de Docteur de l'UTC



Soutenue le 24 juin 2024

Spécialité : Génie des Procédés et Bioprocédés : Transformations intégrées de la matière renouvelable (EA-4297)

D2814

THÈSE DE DOCTORAT

École doctorale : Sciences pour l'ingénieur
Spécialité : Génie des Procédés et Bioprocédés

Présentée par

Adila GHERABLI

En vue d'obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Technologie de Compiègne

Amélioration des conditions de bioproduction et d'extraction des caroténoïdes à partir des microalgues psychrophiles : *Sphaerocystis sp.* et *Pleurastrum sp.*

Soutenue le 24 juin 2024 devant le jury composé de :

Pascale Gillon	Directrice de recherche GEPEA, CNRS- Nantes Université	Rapporteuse
Anne-Sylvie Fabiano-Tixier	Maître de Conférences HDR, Directrice adjointe de l'UMR 408 SQPOV-Avignon Université	Rapporteuse
Benoît Schoefs	Professeur, CNRS-Le Mans Université	Examineur
Mohamed Koubaa	Enseignant chercheur HDR, Université de Technologie de Compiègne	Examineur
Nabil Grimi	Professeur des université, Université de Technologie de Compiègne	Directeur de thèse
Julien Lemaire	Docteur Maître de Conférences, CentraleSupélec, Université Paris-Saclay	Directeur de thèse
Madeleine Charbonnier	Ingénieure de recherche, LGPM- CentraleSupélec, Université Paris-Saclay	Membre invitée
Fanny Duval	Assistante Ingénieure de recherche, LGPM- CentraleSupélec, Université Paris-Saclay	Membre invitée

Résumé

Cette thèse porte sur l'amélioration de la production des caroténoïdes à partir de deux souches de microalgues psychrophiles, *Sphaerocystis sp.* et *Pleurastrum sp.* Ces souches peuvent se développer à basse température et à faible intensité lumineuse, et synthétisent l'astaxanthine et d'autres caroténoïdes en réponse à des stress abiotiques.

L'étape de culture s'est déroulée en deux phases : verte et rouge. Au cours de la phase verte, il a été observé que *Pleurastrum sp.* affiche un taux de croissance de 0,23 jour⁻¹ et une concentration en matière sèche finale de 1,2 g/L sous des conditions de température de 12 °C, une intensité lumineuse faible de 78 μmol/m²/s, et un taux de 2% en CO₂, dans le milieu BBM. De son côté, *Sphaerocystis sp.*, a montré un taux de croissance de 0,38 jour⁻¹ et une concentration en matière sèche finale de 1,45 g/L dans des conditions similaires sauf à un taux de 1% en CO₂.

Dans la phase rouge, la teneur en caroténoïdes totaux a varié entre 2 et 7 mg/g MS. L'exposition de *Pleurastrum sp.* en floccs à une forte intensité lumineuse ou à une carence en phosphate a conduit à une production importante en caroténoïdes totaux et secondaires, ces derniers constituant jusqu'à 41,6% des caroténoïdes totaux, alors que la lutéine atteignait environ 48%. Pour *Sphaerocystis sp.*, une carence initiale en azote et en phosphore, combinée à une lumière intense, a stimulé la production de caroténoïdes, notamment de canthaxanthine, d'adonixanthine et d'astaxanthine. Les caroténoïdes secondaires peuvent atteindre 86,4% des caroténoïdes totaux à la fin de la phase rouge.

L'extraction des caroténoïdes a été facilitée par l'utilisation des traitements mécaniques. Sur *Haematococcus pluvialis*, le solvant DMSO s'est révélé particulièrement efficace permettant d'atteindre un rendement de 88% en seulement 30 minutes sans aucun prétraitement. Les prétraitements par ultrasons (US) et par champ électrique pulsé (CEP) ont permis d'accélérer la cinétique d'extraction avec l'éthanol, qui est le solvant le moins efficace. Sans prétraitement, l'éthanol nécessite 24 heures pour atteindre un rendement de 40%. L'extraction à l'éthanol après traitement CEP n'a augmenté que légèrement le rendement (de 30-35% à 40-45%), contrairement au traitement US qui a permis d'atteindre un rendement de 70-75%.

Sur *Sphaerocystis sp.*, les ultrasons semblent permettre d'extraire davantage de caroténoïdes avant l'étape d'extraction, avec un rendement potentiel de 40-60%. L'extraction au DMSO pourrait ensuite permettre d'atteindre un rendement potentiel de 80-90%. L'extraction au DMSO après le traitement CEP augmente significativement le rendement d'extraction, passant de 10% à 82%. Cela suggère que le traitement CEP semble être moins efficace que le traitement par US. Enfin, sur *Pleurastrum sp.*, le broyage à billes et le DMSO se sont avérés efficaces, avec des rendements d'extraction de 75-95%.

Bien que, les microalgues psychrophiles soient moins productives, avec une teneur en caroténoïdes totaux qui est 7 fois inférieure à celle produite par *H.pluvialis*, elles présentent une variété de caroténoïdes, tels que la canthaxanthine, l'adonixanthine, l'astaxanthine et la lutéine. Ces découvertes constituent une fondation robuste pour l'optimisation future du procédé, dans le but d'augmenter la production de biomasse en photobioréacteur et le rendement des caroténoïdes à partir des souches sélectionnées.

Abstract

This thesis focuses on improving the production of carotenoids from two strains of psychrophilic microalgae, *Sphaerocystis sp.* and *Pleurastrum sp.* These strains can grow at low temperature and low light intensity and synthesize astaxanthin and other carotenoids in response to abiotic stress.

The culture step was carried out in two phases: green and red. During the green phase, it was observed that *Pleurastrum sp.* displays a growth rate of 0.23 day^{-1} and a final dry matter concentration of 1.2 g/L under conditions of $12 \text{ }^{\circ}\text{C}$ temperature, a low light intensity of $78 \text{ } \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$, and a rate of $2\% \text{ CO}_2$, in the BBM medium. On its side, *Sphaerocystis sp.*, showed a growth rate of 0.38 day^{-1} and a final dry matter concentration of 1.45 g/L under similar conditions except at a rate of $1\% \text{ CO}_2$.

In the red phase, the total carotenoid content varied between 2 and 7 mg/g DM. The exposure of *Pleurastrum sp.* in flocs to high light intensity or a phosphate deficiency led to a significant production of total and secondary carotenoids, the latter constituting up to 41.6% of the total carotenoids, while lutein reached about 48%. For *Sphaerocystis sp.*, an initial deficiency in nitrogen and phosphorus, combined with intense light, stimulated the production of carotenoids, notably canthaxanthin, adonixanthin, and astaxanthin. Secondary carotenoids can reach 86.4% of the total carotenoids at the end of the red phase.

The extraction of carotenoids was facilitated by the use of mechanical treatments. On *H.pluvialis*, the DMSO solvent proved to be particularly effective, allowing to reach a yield of 88% in only 30 minutes without any treatment. Pretreatments by ultrasound (US) and pulsed electric field (PEF) allowed to accelerate the extraction kinetics with ethanol, which is the least effective solvent. Without pretreatment, ethanol requires 24 hours to reach a yield of 40%. Ethanol extraction after PEF treatment only slightly increased the yield (from 30-35% to 40-45%), unlike US treatment which allowed to reach a yield of 70-75%.

On *Sphaerocystis sp.*, ultrasound seems to allow to extract more carotenoids before the extraction step, with a potential yield of 40-60%. DMSO extraction could then allow to reach a potential yield of 80-90%. DMSO extraction after PEF treatment significantly increases the extraction yield, going from 10% to 82%. This suggests that PEF treatment seems to be less effective than US treatment. Finally, on *Pleurastrum sp.*, bead milling and DMSO proved to be effective, with extraction yields of 75-95%.

Although psychrophilic microalgae are less productive, with a total carotenoid content that is 7 times lower than that produced by *H.pluvialis*, they present a variety of carotenoids, such as canthaxanthin, adonixanthin, astaxanthin, and lutein. These findings constitute a robust foundation for future process optimization, intending to increase biomass production in photobioreactor and the yield of carotenoids from the selected strains.

Remerciements

Je souhaite avant tout exprimer ma gratitude la plus profonde envers mes directeurs de thèse, Nabil Grimi et Julien Lemaire, ainsi qu'envers mes encadrantes, Madeleine Charbonnier et Fanny Duval. Votre confiance, votre accompagnement et votre soutien constant tout au long de ce voyage ont été inestimables. Bien que le parcours n'ait pas été facile, nous avons réussi ensemble à surmonter un tas d'obstacles, presque de tout types. Merci pour toutes les questions stimulantes et les discussions enrichissantes que nous avons eues, qui ont permis de faire progresser ce travail de recherche. Merci pour les nombreuses, minutieuses et précieuses relectures.

Je souhaite remercier Madame Pascale Gillon et Madame Anne-Sylvie Fabiano-Textier pour avoir accepté d'être les rapporteuses de cette thèse. Mes remerciements s'adressent également à Monsieur Benoît Schoefs et Monsieur Mohamed Koubaa pour avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à remercier Monsieur Patrick Perré qui m'a permis de rejoindre la Chaire de Biotechnologie de CentraleSupélec et de réaliser mes travaux au sein de l'équipe biotransformation. Merci à tous les membres du personnel que j'ai eu le plaisir de côtoyer au Centre Européen de Biotechnologie et de Bioéconomie -professeurs, enseignants, staff administratif, ingénieurs, techniciens, post docteurs, doctorants, et stagiaires-.

Je remercie Yacine Diagne et Julie Voinçon pour leur contribution à l'avancement de ma recherche de thèse durant leurs stages à la Chaire de Biotechnologie. Merci à vous deux pour votre curiosité scientifique envers le sujet, votre patience et vos efforts. Votre implication a été essentielle pour le succès de ce projet.

Un merci particulier va à Madame Christelle Snoeck, chargée de gestion administrative, à Madame Nadia Boussetta, enseignante membre de l'équipe TAI, et à Madame Véronique Desseaux, notre assistante partie en retraite au département Génie de Procédés à l'UTC. Votre bonne humeur et votre soutien indéfectible lors des moments difficiles que j'ai dû surmonter ont été d'une aide précieuse. Merci encore !

Mon remerciement va également à l'ensemble des post docteurs, doctorants et stagiaires des différentes équipes de recherches de TIMR/UTC. Bien que la liste soit un peu longue, je les remercie tous pour les discussions, les nombreuses pauses cafés/déjeuner, les dîners au resto du soir et les voyages. Merci pour votre capacité à me supporter, à me changer les idées et à me faire rire, malgré tout.

J'adresse ma gratitude la plus sincère envers ma famille, pour leur amour, leur soutien inconditionnel et leurs encouragements constants, malgré la grande distance qui nous sépare. Même un millier de mercis ne saurait suffire à exprimer toute ma reconnaissance.

Et pour finir, j'exprime ma gratitude envers mes compagnons et alliés les plus fidèles, mes yeux pour observer, mon cerveau pour réfléchir et analyser, mes mains pour écrire et manipuler et mes pieds pour courir, enfin mon corps entier !. Je suis reconnaissante pour sa résilience, pour sa capacité à me porter et me permettre de persévérer, même lorsque je me sens épuisée.

Table des matières

Avant-Propos	13
Introduction générale	14
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique	17
1 Introduction	17
2 Caroténoïdes d'intérêt	17
2.1 Classification et structure	17
2.2 Propriétés physico-chimiques	19
2.2.1 Configuration spatiale	19
2.2.2 Photoprotection et coloration	19
2.2.3 Activité antioxydante, anti-radicaux libres	19
2.2.4 Solubilité	19
2.3 Propriétés bioactives et applications	20
2.4 Marché des caroténoïdes	20
2.5 Biosynthèse des caroténoïdes : voies métaboliques	21
2.6 Synthèse chimique des caroténoïdes	22
2.6.1 Méthode de l'oléfination double de Wittig	22
2.6.2 Méthode de réaction de Grignard	22
2.6.3 Caroténoïdes naturels versus caroténoïdes synthétiques	22
3 Généralités sur les microalgues	24
3.1 Biodiversité et classification	24
3.2 Structure cellulaire	25
3.2.1 Membrane plasmique et paroi cellulaire	25
3.2.2 Cytoplasme et organites cellulaires	27
3.2.3 Composition biochimique	27
3.3 Applications et intérêt	27
3.3.1 Nutrition humaine et application en cosmétique	28
3.3.2 Nutrition animale et aquaculture	28
3.3.3 Production de biocarburants	29
4 Les microalgues productrices de caroténoïdes d'intérêt	29
4.1 Microalgues mésophiles	29
4.1.1 Haematococcus pluvialis	29
4.1.2 Dunaliella salina	31
4.1.3 Chlorella zofingiensis	32
4.2 Microalgues psychrophiles et psychrotolérantes	32
4.2.1 Environnement naturel d'origine	32
4.2.2 Mode de vie des microalgues de neiges	34
4.2.3 Souches, forme et caractéristiques cellulaires	35
4.2.4 Biosynthèse des lipides et des caroténoïdes secondaires	36
4.3 Stratégies d'induction de la synthèse des caroténoïdes secondaires	36
4.3.1 Effet de la carence en nutriments	37
4.3.2 Effet de la température	37

4.3.3	Effet de l'intensité lumineuse	38
4.3.4	Effet de la salinité	38
4.3.5	Culture en deux étapes	38
5	Technologies de culture puis de traitement des microalgues	41
5.1	Systèmes de culture	41
5.1.1	Systèmes ouverts	41
5.1.2	Systèmes ouverts non-agités	42
5.1.3	Systèmes ouverts agités	42
5.1.4	Systèmes fermés ou photobioréacteurs (PBR)	43
5.1.5	Système de culture hybride en deux phases	44
5.2	Modes de culture	44
5.2.1	Mode autotrophe	44
5.2.2	Mode hétérotrophe	44
5.2.3	Mode mixotrophe	44
5.3	Exemples de production de <i>microalgues</i> à grande échelle	45
5.3.1	Production d'astaxanthine à partir d' <i>H. pluvialis</i>	45
5.3.2	Production d'astaxanthine à partir de <i>C.zofingiensis</i>	45
5.3.3	Production de bêta-carotène à partir de <i>D.salina</i>	46
5.4	Méthodes de récolte	46
5.4.1	Centrifugation	47
5.4.2	Filtration	47
5.4.3	Sédimentation	47
5.4.4	Floculation	47
5.5	Méthodes de séchage	47
5.5.1	Séchage par atomisation	48
5.5.2	Lyophilisation	48
5.5.3	Séchage au tambour	48
5.5.4	Séchage solaire	48
5.6	Méthodes de rupture cellulaire	49
5.6.1	Broyage à billes	49
5.6.2	Champs électriques pulsés	49
5.6.3	Ultrasonication	51
5.7	Extraction au solvant	52
5.8	Méthodes de séparation et de purification	53
5.8.1	Chromatographie semi-préparative	53
5.8.2	Chromatographie liquide-liquide sur colonne	53
6	Conclusion	55
Chapitre 2 : Matériels et méthodes		56
1	Souches sélectionnées	56
1.1	<i>Pleurastrum</i> sp.	57
1.2	<i>Sphaerocystis</i> sp.	57
1.3	<i>Haematococcus pluvialis</i>	58
2	Milieux de culture	58
3	Méthodes de suivi des cultures microalgales	59

3.1	Mesure de la densité optique	59
3.2	Mesure de la matière sèche	60
3.3	Mesure de la concentration en nutriments	60
3.4	Mesure du pH	61
3.5	Observations morphologiques	61
3.6	Lyophilisation des biomasses	61
4	Méthodes d'extraction des pigments	61
4.1	Extraction au solvant	62
4.2	Extraction assistée par broyage à billes	62
4.2.1	Broyage à bille - modèle MP Biomedicals FastPrep-24 TM 5G	62
4.2.2	Broyage à bille - modèle RETCH Mixer Mill MM 400	63
4.3	Extraction assistée par ultrasons	63
4.4	Extraction assistée par champs électrique pulsés	64
5	Quantification des pigments	64
5.1	Saponification chimique de l'astaxanthine estérifiée	64
5.2	Quantification des pigments par HPLC-UV DAD	65
5.3	Quantification des pigments par spectrophotométrie	66
5.3.1	Chlorophylles et caroténoïdes totaux	66
5.3.2	Astaxanthine totale	67
5.4	Séparation qualitative des caroténoïdes par CCM et HPTLC	68
5.5	Quantification des acides gras par GC-MS	68
Chapitre 3 : Résultats et discussion		69
Section 1 : Étude de la culture des souches psychrophiles en phase verte		69
1	Introduction	69
2	Méthodologie	69
2.1	Choix des conditions opératoires	69
2.2	Tests préliminaires d'adaptation	70
2.3	Amélioration des conditions de croissance en phase verte	70
3	Résultats de l'adaptation des souches	72
3.1	Pleurastrum sp.	72
3.2	Sphaerocystis sp.	73
3.3	Description morphologique des deux microalgues	74
4	Résultats de l'amélioration des conditions de croissance	75
4.1	Pleurastrum sp.	75
4.1.1	Effet de la température : conditions C et F	75
4.1.2	Effet de l'intensité lumineuse : conditions A, B et C	77
4.1.3	Effet de la source de carbone : conditions C, D et E	80
4.2	Sphaerocystis sp.	82
4.2.1	Effet de la température : conditions C et F	82
4.2.2	Effet de l'intensité lumineuse : conditions A, B et C	84
4.2.3	Effet de la source de carbone : conditions C, D et E	86
5	Conclusion	89

Section 2 : Étude de la culture des souches psychrophiles en phase rouge		90
1	Introduction	90
2	Méthodologie générale	90
2.1	Milieux de culture	90
2.2	Paramètres de culture en photo-incubateur	91
2.3	Paramètres de culture en photo-bioréacteur	91
2.4	Suivi des cultures	92
2.5	Extraction et quantification des pigments et des lipides	92
3	Expériences sur <i>Pleurastrum sp.</i>	93
3.1	Étude préliminaire de la phase rouge en fiole Erlenmeyer	93
3.1.1	Méthode de production de biomasse en PBR de 6 L	93
3.1.2	Résultats de production de biomasse en PBR de 6 L	93
3.1.2.1	Suivi de la croissance	93
3.1.2.2	Suivi de la consommation des nutriments	95
3.1.2.3	Quantification des pigments	96
3.1.3	Méthodologie de l'étude préliminaire en phase rouge	97
3.1.4	Résultats de l'étude préliminaire en phase rouge	98
3.1.4.1	Observation visuelle et microscopique	98
3.1.4.2	Quantification des pigments	99
3.2	Étude approfondie de la phase rouge en fiole Erlenmeyer	101
3.2.1	Méthodologie de l'étude approfondie	101
3.2.2	Résultats de l'étude approfondie	101
3.2.2.1	Suivi de la production de biomasse	101
3.2.2.2	Observation visuelle et microscopique	102
3.2.2.3	Quantification des pigments	103
3.3	Étude de la phase rouge à l'échelle du photo-bioréacteur	105
4	Expériences sur <i>Sphaerocystis sp.</i>	105
4.1	Étude préliminaire de la phase rouge en fiole Erlenmeyer	105
4.1.1	Méthodologie de l'étude préliminaire	105
4.1.2	Résultats de l'étude préliminaire	106
4.1.2.1	Observation visuelle et microscopique	106
4.1.2.2	Quantification des pigments	107
4.2	Étude complémentaire de la phase rouge en fiole Erlenmeyer	109
4.2.1	Méthodologie de l'étude complémentaire	109
4.2.2	Résultats de l'étude complémentaire	110
4.2.2.1	Suivi de croissance	110
4.2.2.2	Suivi de la consommation des nutriments	111
4.2.2.3	Quantification des pigments	112
4.3	Étude de la phase rouge à l'échelle du photo-bioréacteur	114
4.3.1	Méthode de production de biomasse	114
4.3.1.1	Suivi de la production de biomasse	114
4.3.1.2	Suivi de la production de caroténoïdes	117

5	Comparaison de la culture des deux souches en photo-bioréacteur	119
5.1	Production de caroténoïdes	119
5.2	Production d'acides gras	120
6	Conclusion	122
Section 3 : Comparaison de méthodes de prétraitement pour améliorer l'extraction des caroténoïdes à partir de microalgues		124
1	Introduction	124
2	Méthodologie générale	124
2.1	Préparation de la biomasse	124
2.2	Méthodes d'extraction	125
2.3	Méthodes d'analyse des pigments	126
3	Résultats de l'étude avec <i>Haematococcus pluvialis</i>	126
3.1	Effet du solvant d'extraction	126
3.2	Effet du temps d'extraction au solvant	127
3.3	Effet de prétraitements physiques sur l'extraction	128
4	Résultats de l'étude avec <i>Sphaerocystis sp.</i>	130
4.1	Effet des prétraitements physiques sur l'extraction	130
4.2	Effet du broyage avec le DMSO	130
5	Résultats de l'étude avec <i>Pleurastrum sp.</i>	132
6	Comparaison générale des caroténoïdes des souches étudiées	133
7	Conclusion	136
Conclusions et perspectives		138
Références bibliographiques		141
Liste des figures		172
Liste des tableaux		178
Annexes		180

Avant-Propos

Tout d'abord, cette thèse a été réalisée dans le cadre d'une bourse d'excellence, fruit d'une collaboration Franco-Algérienne.

Les travaux de recherche présentés dans cette thèse se sont déroulés conjointement à la chaire de Biotechnologie de CentraleSupélec du laboratoire de Génie des Procédés et Matériaux et au laboratoire de Transformations Intégrées de la Matière Renouvelable, au département de Génie de Procédés Industriels à l'Université de Technologie de Compiègne. Au cours de ce travail, des communications scientifiques ont été réalisées, ainsi qu'une publication d'une revue bibliographique.

Listes de communications :

GHERABLI A., CHARBONNIER M., DUVAL F., LEMAIRE J., GRIMI N., *Bio-Production Optimization of Antioxidant "Astaxanthin", Purified from Psychrophilic Microalgae*, Journée « Journées Formulation de la Société Chimique de France : « Substitution et Reformulation : défis d'aujourd'hui, produits de demain », 29 Novembre – 1 Décembre 2021, Université de Technologie de Compiègne. (Poster)

GHERABLI A., CHARBONNIER M., DUVAL F., LEMAIRE J., GRIMI N., *Optimization of carotenoids bioaccumulation by psychrophilic microalgae culture*, Congrès «18^{ème} congrès de la Société Française de Génie des Procédés, Sciences et solutions technologiques pour la transition», 7-10 Novembre 2022, Centre de Congrès Pierre Baudis, Toulouse. (Poster)

GHERABLI A., CHARBONNIER M., DUVAL F., LEMAIRE J., GRIMI N., *Pulsed Electric Field Assisted Extraction of Carotenoids from Psychrophilic Microalgae*, École d'été «8th School on Pulsed Electric Field Application in Food and Biotechnology», 30 Mai - 3 Juin 2022, Université de Technologie de Compiègne. (Oral)

GHERABLI A., CHARBONNIER M., DUVAL F., LEMAIRE J., GRIMI N., *Carotenoids Bioproduction by Two Psychrophilic Microalgae: Sphaerocystis sp. and Pleurastrum sp.*, Congrès «1st International Conference On Biomass Valorization for Sustainable Applications, BIOVASA, UNESCO GSC Chair», 2-3 November 2023, Maroc. (Oral)

GHERABLI A., LEMAIRE J., CHARBONNIER M., DUVAL F., GRIMI N., *Carotenoids Bioproduction by Two Psychrophilic Microalgae : Sphaerocystis sp. and Pleurastrum sp.*, Colloque interUT « Technological Systems, Sustainability, and Safety», 7-8 Février 2024, Sorbonne Université Paris. (Oral)

GHERABLI A., GRIMI N., LEMAIRE J., VOROBIEV E., LEOVKA N., *Extraction of Valuable Biomolecules from the Microalga Haematococcus pluvialis Assisted by Electrotechnologies* (2023). *Molecules* 28(5), 2089. (revue bibliographique)

Introduction générale

Face à la crise énergétique actuelle, au changement climatique et à l'augmentation de la demande d'ingrédients biosourcés, les microalgues suscitent un intérêt grandissant. Elles se positionnent comme une solution écologique et durable pour répondre aux défis contemporains. Les microalgues sont une source naturelle et prometteuse d'ingrédients de haute qualité pour la nutrition humaine et animale, ainsi que de molécules biosourcées aux applications diversifiées dans les industries cosmétiques et pharmaceutiques. De surcroît, leur culture offre des avantages environnementaux considérables : séquestration du dioxyde de carbone, épuration de l'eau en absorbant l'azote et le phosphore dissous et conversion de la biomasse en biocarburants. Enfin, elles peuvent être cultivées en terres non arables, évitant ainsi toute concurrence avec les cultures destinées à l'alimentation.

Au cours de ces dernières années, les caroténoïdes extraits à partir des microalgues ont attiré l'attention des chercheurs en raison de leurs propriétés puissantes. Ces composés trouvent une large gamme d'applications dans les industries alimentaires (humaine et animale), cosmétiques et pharmaceutiques. Bien qu'ils soient traditionnellement obtenus par extraction de biomasse végétale ou par synthèse chimique, ces méthodes présentent néanmoins des limites. C'est pourquoi les industries se sont orientées vers les microalgues comme source alternative de caroténoïdes. L'astaxanthine, un caroténoïde particulièrement précieux, est notamment produit par les microalgues mésophiles *Haematococcus pluvialis* et *Chlorella zofingiensis*. Toutefois, face aux coûts énergétiques élevés associés à la production de ces microalgues mésophiles, l'industrie cherche des sources alternatives.

Dans ce contexte, certaines recherches ont révélé des informations intéressantes. Diverses espèces de microalgues, qui habitent la neige et les glaciers, sont capables de produire des biomolécules d'une grande valeur, comme l'astaxanthine et des acides gras polyinsaturés. Ces microalgues, présentes dans les régions alpines et polaires, sont responsables du phénomène connu sous le nom de « sang de neiges ». Leur capacité à prospérer dans des conditions environnementales difficiles fait des microalgues de neige des candidates idéales pour la culture en extérieur. Cette découverte ouvre de nouvelles opportunités pour l'industrie des caroténoïdes et des lipides. Ces microalgues, plus tolérantes et adaptées à des climats moins chauds et ensoleillés, se positionnent comme des candidates potentielles pour développer des procédés de culture et de production des molécules à haute valeur à moindre coût. En effet, la culture des microalgues nécessite un éclairage artificiel, ce qui consomme une quantité substantielle d'électricité. De plus, le maintien de la température et des conditions opératoires idéales pour la croissance des microalgues implique également des systèmes de chauffage ou de refroidissement énergivore. Par conséquent, le coût énergétique peut devenir prohibitif dans les régions où les coûts de l'énergie sont élevés ou les sources renouvelables sont limitées.

Ces défis soulignent l'importance de développer les recherches pour optimiser la culture des microalgues de neiges, en particulier dans les régions au climat froid, telles que l'Europe du

Nord. Ainsi, l'exploration des microalgues de neige pourrait bien représenter une avancée majeure pour l'industrie des caroténoïdes, permettant de réduire les coûts de production tout en préservant l'environnement.

C'est avec cette ambition que cette thèse est entreprise, visant à étudier le potentiel de deux microalgues psychrophiles, *Sphaerocystis sp.* et *Pleurastrum sp.*, pour la production de biomasse, et de caroténoïdes. L'étude se déroule en deux phases de culture : la phase de croissance et la phase d'accumulation des caroténoïdes. Les travaux seront initialement menés à l'échelle des fioles Erlenmeyers, avant d'être étendus à un photo-bioréacteur de 6 litres. Enfin, l'efficacité de l'extraction des caroténoïdes à partir de deux souches psychrophiles, sera étudiée. Ces souches seront comparées à la souche de référence *Haematococcus pluvialis* en utilisant diverses méthodes de traitement et d'extraction.

Structure du manuscrit

Ce manuscrit comprend trois chapitres ainsi que les conclusions et les perspectives de ces travaux de thèse dont le détail est donné ci-dessous :

- ✓ **Chapitre 1** : C'est une synthèse bibliographique qui donne un aperçu des caroténoïdes issus des microalgues. Il aborde leur classification, leurs propriétés, leurs méthodes de synthèse, leurs applications et leur place sur le marché. Le chapitre met en lumière la production de certains caroténoïdes, l'astaxanthine et le bêta-carotène, par certaines microalgues. Il explore également le potentiel des microalgues de neige en tant que nouvelles sources de ces composés. Enfin, il détaille les procédés utilisés pour les microalgues productrices des caroténoïdes, y compris la culture, la récolte, le séchage, l'extraction et la purification.
- ✓ **Chapitre 2** : Il fournit une présentation exhaustive du matériel et des méthodes expérimentales utilisées pour réaliser les objectifs définis dans ce travail. Il décrit en détail les méthodologies suivies et les outils utilisés, offrant ainsi une vue d'ensemble complète de la méthodologie de recherche. Cette méthodologie est spécifiquement pour la production des microalgues psychrophiles et l'extraction de leurs caroténoïdes.
- ✓ **Chapitre 3** : Il présente les résultats obtenus, divisés en trois sections :
 - **Section 1** : Elle se concentre sur l'étude de la culture en phase verte des deux souches psychrophiles sélectionnées, *Pleurastrum sp.* et *Sphaerocystis sp.* La première partie de ce chapitre détaille les études préliminaires qui visaient à acclimater ces souches psychrophiles aux conditions de culture choisies. La deuxième partie, quant à elle, analyse l'effet des conditions de culture sur la croissance cellulaire. L'objectif principal est d'améliorer la productivité en biomasse. Plus précisément, cette partie étudie spécifiquement l'influence de la variation de l'intensité lumineuse, de la température et de la source de carbone sur la croissance des souches.
 - **Section 2** : Elle se consacre à une étude approfondie de la culture des souches psychrophiles, d'abord à l'échelle des fioles, puis à celle du photobioréacteur.

L'objectif est de recueillir des données essentielles en caractérisant leur production de caroténoïdes secondaires et de lipides. Cette recherche vise concrètement à identifier différentes conditions de stress en phase rouge induisant une meilleure productivité en termes de biomasse et de caroténoïdes secondaires.

- **Section 3** : Elle se concentre sur l'application des méthodes de traitements et d'extraction de caroténoïdes sur *H.pluvialis* et les souches psychrophiles produites en phase rouge. Elle détaille les techniques utilisées pour récupérer ces molécules, en étudiant l'impact des traitements appliqués sur la teneur finale obtenue pour chaque microalgue.
- ✓ **Conclusion et perspectives** : Cette partie ouvre une synthèse exhaustive des différents travaux menés durant cette thèse. Elle met en avant les perspectives futures qui découlent directement de cette thèse. Un accent particulier est mis sur le procédé de culture des microalgues psychrophiles, qui présente un potentiel pour la production de caroténoïdes secondaires.

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

1 Introduction

Ce premier chapitre offre une vue d'ensemble des caroténoïdes d'intérêt à partir des microalgues. La première section traite de la classification, des propriétés, des méthodes de synthèse et des diverses applications ainsi que du marché des caroténoïdes. Ensuite, il met en évidence la production spécifique de certains caroténoïdes, notamment l'astaxanthine et le bêta-carotène par le biais des microalgues, en particulier, *Haematococcus pluvialis*, *Dunaliella salina* et *Chlorella zofingiensis*. Le chapitre se poursuit en explorant d'autres microalgues potentielles, en l'occurrence les microalgues des neiges, pour la production des lipides et des caroténoïdes. En dernier lieu, il comprend également des détails sur la culture de ces microalgues, dans la même mesure, les procédés de récolte, de séchage, d'extraction et de purification des caroténoïdes qu'elles produisent.

2 Caroténoïdes d'intérêt

2.1 Classification et structure

Le rayonnement solaire est une source d'énergie lumineuse essentielle pour la vie sur terre. Parmi les récepteurs de cette énergie, nous trouvons les organismes photosynthétiques tels que les plantes supérieures, les microalgues et certaines bactéries. Ils confèrent ainsi une source d'énergie secondaire pour d'autres organismes. Les cellules et les tissus de ces organismes photosynthétiques sont caractérisés par leur capacité à se protéger contre les dommages photo-induits ou oxydatifs. Cette protection est assurée grâce à la biosynthèse de photorécepteurs sensibles, notamment des pigments appelés « caroténoïdes ». Certains de ces pigments jouent un rôle crucial dans le mécanisme d'absorption de l'excès de lumière. Les plantes supérieures (comme les fruits, les légumes et les fleurs), les algues, certaines bactéries photosynthétiques et non photosynthétiques, les cyanobactéries, ainsi que certaines espèces de levures et de champignons, sont capables de synthétiser des caroténoïdes. Ce sont des antioxydants qui confèrent également à ces organismes des colorations allant du rouge au jaune en passant par l'orange. En outre, en association avec des protéines, ces molécules peuvent être responsables d'autres couleurs, comme le violet, le vert et le bleu, en formant des molécules appelées caroténo-protéines (Britton, 2008).

Le terme « caroténoïde » est dérivé de *Daucus carota*, le nom latin de la carotte, où le bêta-carotène, un précurseur de la vitamine A, a été découvert pour la première fois. Cette découverte a conduit à la nomination de toute cette classe de pigments naturels. Dans les tissus végétaux, les caroténoïdes sont accumulés dans des structures spécifiques appelées plastides. Ces plastides peuvent être des chromoplastes (qui donnent de la couleur), des amyloplastides (qui stockent l'amidon) ou des élaïoplastides (qui stockent les lipides). Dans les fruits, les fleurs et les racines, les caroténoïdes sont généralement localisés dans les chromoplastes (González-Peña et al., 2023).

La plupart des caroténoïdes naturels identifiés sont des tétra-terpénoïdes $C_{40}H_{56}$. Ils sont formés de huit unités d'isoprène avec des structures cycliques ou linéaires aux deux extrémités des chaînes de carbone, et sont formés par désaturation et modification du squelette symétrique (Sathasivam et al., 2021). Selon la base de données des caroténoïdes, 1204 caroténoïdes naturels ont été identifiés à ce jour, provenant de 722 organismes différents. Ces molécules, qui ne contiennent pas d'azote, peuvent être classés en trois catégories en fonction du nombre d'atomes de carbone dans leur structure :

- Les caroténoïdes C_{30} et C_{50} : ils sont moins courants et sont synthétisés par des bactéries non photosynthétiques et des archées. Leur structure comprend respectivement six et dix unités isoprènes entre les carbones 5 situés à chaque extrémité de la chaîne.
- Caroténoïdes C_{45} : ils sont exclusivement synthétisés par certaines espèces bactériennes. Leur structure contient neuf unités isoprènes.
- Caroténoïdes C_{40} : ils constituent la catégorie de caroténoïdes la plus répandue dans la nature et peuvent être biosynthétisés par des eucaryotes, des archées et des bactéries. Leur structure contient huit unités isoprènes et ils sont symétriques.

La classification des caroténoïdes dans la littérature englobe deux groupes principaux : les xanthophylles et les carotènes. Les carotènes, tels que le bêta-carotène, le torulène et le lycopène, sont des caroténoïdes hydrocarburés. En revanche, les xanthophylles sont des dérivés oxygénés des carotènes et se caractérisent par la présence d'oxygène dans divers groupements fonctionnels de leur structure (**Figure 1**). Par exemple, on peut trouver de l'oxygène dans un groupement hydroxyle (comme dans la bêta-cryptoxanthine, la lutéine, l'isozéaxanthine et la zéaxanthine), méthoxyle (comme dans la spirilloxanthine), cétonique (comme dans l'astaxanthine et la canthaxanthine) ou époxy (comme dans la violaxanthine, la néoxanthine et la fucoxanthine) (Foong et al., 2021; Gong & Bassi, 2016).

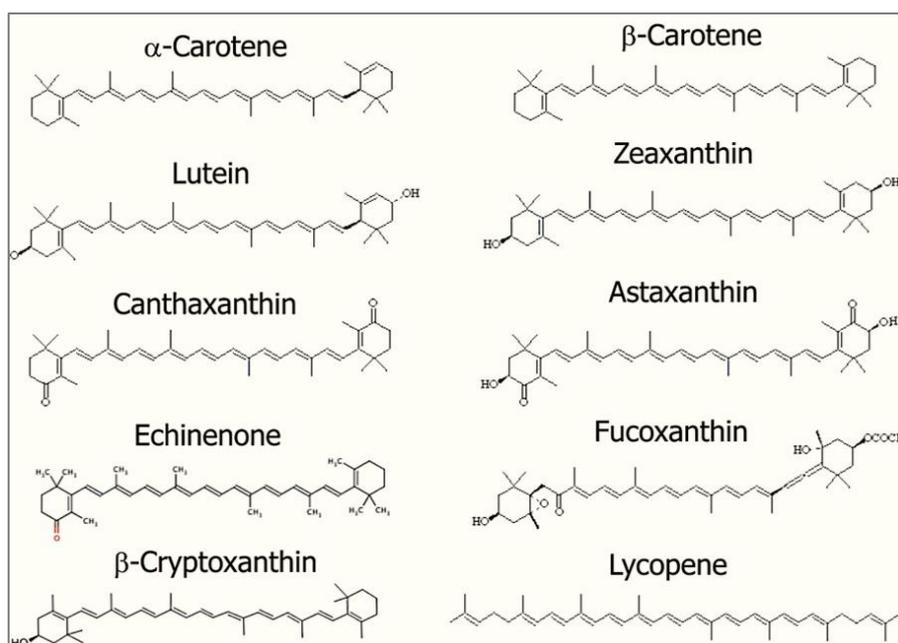


Figure 1 : Structure chimique de certains caroténoïdes (xanthophylles et carotènes).

En outre, les caroténoïdes servent de précurseurs à l'acide abscissique, une hormone végétale qui régule la croissance des plantes et de leurs réponses au stress. Il est donc possible de faire une distinction entre les caroténoïdes primaires et secondaires. Les caroténoïdes primaires sont essentiels à la survie des plantes, tandis que les caroténoïdes secondaires sont produits en réponse à des stimuli spécifiques. Ces derniers contribuent à la capacité d'adaptation des plantes à leur environnement (Henríquez et al., 2016). Même pour les animaux qui ne peuvent pas synthétiser les caroténoïdes, ceux-ci jouent un rôle indispensable. Leur apport se fait donc par la nourriture. Les plantes ou certaines proies représentent la source naturelle qui couvre leurs besoins. Les caroténoïdes ingérés sont métabolisés en micronutriments essentiels, comme un précurseur de la vitamine A (Misawa, 2010). Un exemple parfait de la manière dont les animaux bénéficient des caroténoïdes dans leur régime alimentaire est le flamant rose. Ces oiseaux tirent leur couleur rose distincte des caroténoïdes présents dans leur alimentation, qui comprend principalement des crevettes et des algues. Les caroténoïdes sont métabolisés et déposés dans les plumes du flamant, donnant à l'oiseau sa teinte rose caractéristique. Les caroténoïdes, étudiés pour leurs propriétés très importantes, présentent plusieurs caractéristiques.

2.2 Propriétés physico-chimiques

2.2.1 Configuration spatiale

Les caroténoïdes possèdent une longue chaîne de double liaisons C-C conjuguées qui détermine leur structure, leur réactivité chimique. Ils peuvent adopter différentes configurations, notamment les isomères cis et trans. La plupart des caroténoïdes naturels présentent une configuration trans, qui peut se transformer en configuration cis lorsqu'ils sont exposés à certaines conditions environnementales, comme la lumière et la chaleur ou lors de leur procédé de production (Ninčević Grassino et al., 2023).

2.2.2 Photoprotection et coloration

Grâce à leur structure chimique, les caroténoïdes sont capables d'absorber la lumière, ce qui est essentiel pour leur rôle dans la photosynthèse. Ils protègent l'appareil photosynthétique contre les dommages causés par un excès de lumière. Leur couleur et l'action photo protectrice sont dues à la présence de chromophores (Langi et al., 2018).

2.2.3 Activité antioxydante, anti-radicaux libres

La conjugaison des doubles liaisons est associée aux propriétés photochimiques des caroténoïdes et à la réactivité chimique antioxydante envers certaines molécules, y compris les radicaux libres.

2.2.4 Solubilité

Les caroténoïdes sont liposolubles et présentent une faible solubilité dans l'eau. Les carotènes sont hautement solubles dans les solvants organiques et insolubles dans les solvants polaires, tandis que les xanthophylles sont solubles dans les deux types de solvants (Savy, 2005).

2.3 Propriétés bioactives et applications

Les caroténoïdes naturels se distinguent par leur capacité à être convertis en vitamine A. En particulier, l' α -carotène, la cryptoxanthine et le β -carotène sont des exemples de caroténoïdes qui peuvent subir cette transformation. Cette propriété les rend particulièrement attrayants, car la vitamine A est importante pour la croissance et le développement des tissus épithéliaux des yeux, ainsi dans le maintien du système immunitaire (Nguyen, 2018). D'autres caroténoïdes, tels que l'astaxanthine, la lutéine ou la zéaxanthine, sont reconnus pour leur puissante propriété antioxydante et leurs nombreux bienfaits pour la santé. De nombreuses études suggèrent qu'une supplémentation en lutéine et en zéaxanthine peut aider à prévenir l'évolution de la dégénérescence maculaire, une maladie courante chez les personnes âgées, affectant le *macula lutea* (Amengual, 2019). Par conséquent, ces caroténoïdes peuvent jouer un rôle essentiel dans la prévention contre de diverses maladies, en particulier celles liées au syndrome inflammatoire.

La production naturelle de certains caroténoïdes implique la culture et l'exploitation de diverses espèces de microalgues. Le **Tableau 1** récapitule les principaux caroténoïdes, leur source microalgale et leurs bienfaits dans le secteur d'utilisation.

2.4 Marché des caroténoïdes

Les caroténoïdes les plus couramment utilisés sont le bêta-carotène, la lutéine, la zéaxanthine, la fucoxanthine, la phycobiliprotéine et l'astaxanthine. Le marché global des caroténoïdes devrait atteindre 2,7 milliards d'USD d'ici 2027, contre 2,0 milliards d'USD en 2022 avec un taux de croissance annuel composé (Compounds annual growth rate CAGR) de 5,7% au cours de cette période. Les marchés européens et américains sont les plus demandeurs en caroténoïdes dont les prix varient entre 300 à 3000 USD/kg pour le bêta-carotène et 2500 à 10000 USD/kg pour l'astaxanthine (Yaqoob et al., 2021).

Le marché des caroténoïdes est largement dominé par des produits synthétisés chimiquement, qui sont principalement utilisés dans l'aquaculture et l'alimentation animale. Cette prédominance s'explique en grande partie par des coûts d'investissement et de production moins élevés et une réglementation moins stricte en ce qui concerne leur utilisation. En revanche, les caroténoïdes naturels et biosourcés, tels que ceux issus des microalgues ou des levures, sont soumis à des réglementations plus rigoureuses pour leur utilisation dans le secteur alimentaire, pharmaceutique et cosmétique. Ces réglementations varient d'un pays à l'autre. De plus, leur production est généralement associée à des coûts d'investissement et de production significativement plus élevés, comme l'ont souligné Ambati et al., (2019). Néanmoins, le marché des caroténoïdes biosourcés devrait continuer à se développer, en étant stimulé par la demande croissante d'ingrédients biosourcés et par une prise de conscience croissante de leurs bienfaits pour la santé, comme l'ont suggéré Chini Zittelli et al., (2023).

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des caroténoïdes à grande valeur ajoutée d'origine microalgale et de leurs principaux effets bénéfiques sur la santé, adapté de (Ampofo & Abbey, 2022; Bhalamurugan et al., 2018; Rebelo et al., 2020; Zarekarizi et al., 2023).

Caroténoïdes	E code, couleur	Sources microalgales	Bienfait	Applications
Carotènes	E _{160 a} , jaune à orange	<i>Dunaliella salina</i> , <i>Scenedesmus obliquus</i>	Anti-cancer, activité de Vitamine A	Colorant alimentaire, source de vitamine A
Lycopène	E _{160 d} , rouge	<i>Dunaliella salina</i> , <i>Chlorella marina</i>	Anti-cancer, anti-neuro inflammatoire,	Additif et complément alimentaire
Lutéine	E _{161 b} , orange à jaune	<i>Scenedesmus almerienses</i> , <i>Dunaliella salina</i> , <i>Chlorella protothecoides</i>	Maintien du système immunitaire, anti-inflammatoire	Colorant alimentaire, aliments fonctionnels
Canthaxanthine	E _{161 g} , orange	<i>Chlorella zofingiensis</i> , <i>Botryococcus braunii</i> , <i>Chlorococcum sp.</i>	Propriétés d'élimination des radicaux libres et oxydation des lipides	Agent de bronzage utilisé en cosmétique, complément alimentaire
Fucoxanthine	E _{ng} , jaune à marron	<i>Cylindrotheca closterium</i> <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Anti-inflammatoire, anti-obésité	Additif alimentaire, ingrédient en cosmétique
Astaxanthine	E _{161 j} , rouge	<i>Haematococcus pluvialis</i> , <i>Chlorella zofingiensis</i> , <i>Scenedesmus obliquus</i>	Agent anti-UV, anti inflammatoire, anti-cancer, anti-microbien	Colorant alimentaire, aliments fonctionnels, ingrédient en cosmétique
Phycobili-protéines	E _{ng} , fuchsia, violet	<i>Arthrospira platensis</i>	Prévention de la maladie d'Alzheimer	Colorant alimentaire, aliments fonctionnels

2.5 Biosynthèse des caroténoïdes : voies métaboliques

La biosynthèse des caroténoïdes implique une réaction de condensation entre trois molécules d'isopenténylpyrophosphate (IPP) et une molécule de diméthylallylpyrophosphate (DMAPP). Cette réaction produit un précurseur direct, le géranylgeranyldiphosphate (GGPP ; C20), qui est ensuite transformé en lycopène (C40). Ce dernier sert d'intermédiaire commun pour la synthèse de la majorité des caroténoïdes C40. Pour la synthèse des molécules de base (IPP et DMAPP), les organismes photosynthétiques empruntent la voie du mévalonate (MVA), tandis que les bactéries et les champignons utilisent la voie du 2-C-méthyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP). Chez les microalgues, les deux voies peuvent être mobilisées (Jeon et al., 2021).

Les différentes réactions des voies métaboliques sont illustrées dans la **Figure 2**. En effet, la biosynthèse des caroténoïdes chez les organismes photosynthétiques, en particulier les microalgues, est soumise à un contrôle génétique rigoureux. Cette régulation s'effectue par l'intermédiaire des gènes qui codent pour des enzymes impliquées dans la catabolisation de la synthèse des caroténoïdes. Pour les microalgues, les gènes de biosynthèse des caroténoïdes peuvent être activés ou up-régulés (c'est-à-dire que leur expression est augmentée) en réponse à certaines conditions de stress (Lemoine & Schoefs, 2010).

Dans la microalgue *Haematococcus pluvialis*, la synthèse de l'IDI (Isopentenyl pyrophosphate IPP-isomérase) est codée par deux gènes identifiés, appelés *ipiHP1* et *ipiHP2*. L'IDI est l'enzyme qui catalyse l'isomérisation du précurseur IPP en molécule de DMAPP, une étape cruciale à la fin de la voie MEP et au début des réactions de production de phytoène. Lors d'une exposition à une haute intensité lumineuse, l'expression des deux gènes *ipiHP1* et *ipiHP2* augmente, entraînant ainsi l'accumulation de l'astaxanthine principalement estérifiée.

Chez la microalgue *Chlorella zofingiensis*, une forte intensité lumineuse peut stimuler l'activité de deux enzymes : la BCH (bêta-carotène hydroxylase) et la BKT (bêta-carotène kétolase). Ces enzymes sont responsables de la conversion du bêta-carotène en astaxanthine, via une série de réactions. La synthèse de zéaxanthine augmente également pour être directement convertie en astaxanthine sous l'action de l'enzyme BKT. Cette voie est plus rapide et efficace pour répondre au stress lumineux élevé que la conversion du bêta-carotène en echinenone, puis en canthaxanthine, puis en phoenicoxanthine, sous la régulation de deux enzymes BKT et BCH.

En se basant sur les voies de biosynthèse et les enzymes impliquées, il est suggéré que l'accumulation importante d'astaxanthine chez *H. pluvialis* est due à l'efficacité de la conversion séquentielle du bêta-carotène en astaxanthine via la canthaxanthine, une réaction catalysée par les deux enzymes BKT et CHYb (bêta-caroténoïde hydroxylase). En revanche, chez *C. zofingiensis*, il est probable que l'enzyme BKT, qui catalyse la conversion directe de la zéaxanthine en astaxanthine, soit moins efficace (Boussiba, 2000; Z. Zhang et al., 2019).

Dunaliella salina est une autre microalgue reconnue pour sa production de bêta-carotène (Rammuni et al., 2019). La synthèse des caroténoïdes, qui se produit en réponse à divers stress environnementaux, tels que la salinité élevée, une forte intensité lumineuse, une basse température, et la présence de métaux lourds, est régulée par des gènes uniques appelés CRT.

Les enzymes codés jouent un rôle crucial, notamment dans la conversion du phytoène en lycopène (Ye et al., 2008). Une étude récente a élucidé que le phytoène synthase (PSY) présente une activité élevée lors de la synthèse des caroténoïdes dans *D. salina*. Cette activité est le résultat d'une interaction avec d'autres protéines appelées « protéines oranges OR ». L'étude montre que l'activité de l'enzyme PSY est régulée par l'OR dans le mécanisme de synthèse des caroténoïdes, principalement le bêta-carotène à haute concentration (Liang et al., 2023).

2.6 Synthèse chimique des caroténoïdes

Dans le secteur industriel, diverses méthodes sont couramment employées pour la synthèse chimique des caroténoïdes. Les deux méthodes les plus utilisées à l'échelle industrielle sont décrites ci-après.

2.6.1 Méthode de l'oléfination double de Wittig

La méthode de l'oléfination double de Wittig est utilisée pour produire efficacement des caroténoïdes symétriques et asymétriques. Cette synthèse est basée sur une réaction de couplage entre un composé organique carbonyle (aldéhyde ou cétone) et un réactif organométallique ylure (ylure de phosphonium). Elle génère une double liaison avec un haut niveau de contrôle géométrique pour donner des alcènes, qui sont substitués dans une transformation appelée réaction de Wittig. Cette dernière consiste en l'isomérisation des produits.

Pour la synthèse des caroténoïdes symétriques en C₄₀, tels que le lycopène, le β-carotène, la zéaxanthine, et l'astaxanthine, la réaction implique la condensation d'un dialdéhyde C₁₀ symétrique avec deux équivalents d'un sel de phosphonium C₁₅ appropriés. En ce qui concerne les caroténoïdes asymétriques en C₄₀, comme l'α-carotène, la β-cryptoxanthine et la lutéine, ils peuvent être produits via une synthèse d'un dialdéhyde C₁₀ mono protégée (Ernst, 2002).

2.6.2 Méthode de réaction de Grignard

La réaction de Grignard est une méthode qui conduit à la production des caroténoïdes. Dans cette réaction chimique, une molécule de di-cétone et deux molécules de méthanol se combinent pour générer un caroténoïde avec 40 atomes de carbone. Cette méthode est souvent utilisée pour produire le β-carotène à l'échelle industrielle (Bogacz-Radomska & Harasym, 2018).

2.6.3 Caroténoïdes naturels versus caroténoïdes synthétiques

Les caroténoïdes naturels, qui sont des antioxydants puissants et bénéfiques pour la santé humaine et animale, sont produits en quantités limitées à partir de sources naturelles, ce qui entraîne des coûts élevés. Par contraste, les caroténoïdes synthétiques peuvent être fabriqués de manière plus économique en utilisant des produits chimiques à faible coût (Novoveská et al., 2019). Néanmoins, en raison de la demande croissante pour les ingrédients naturels, certaines applications, en particulier dans le domaine de la nutraceutique, favorisent l'utilisation de caroténoïdes naturels malgré leur coût élevé. Les microalgues pourraient ainsi représenter une source naturelle privilégiée pour la production de telles molécules (Christaki et al., 2013).

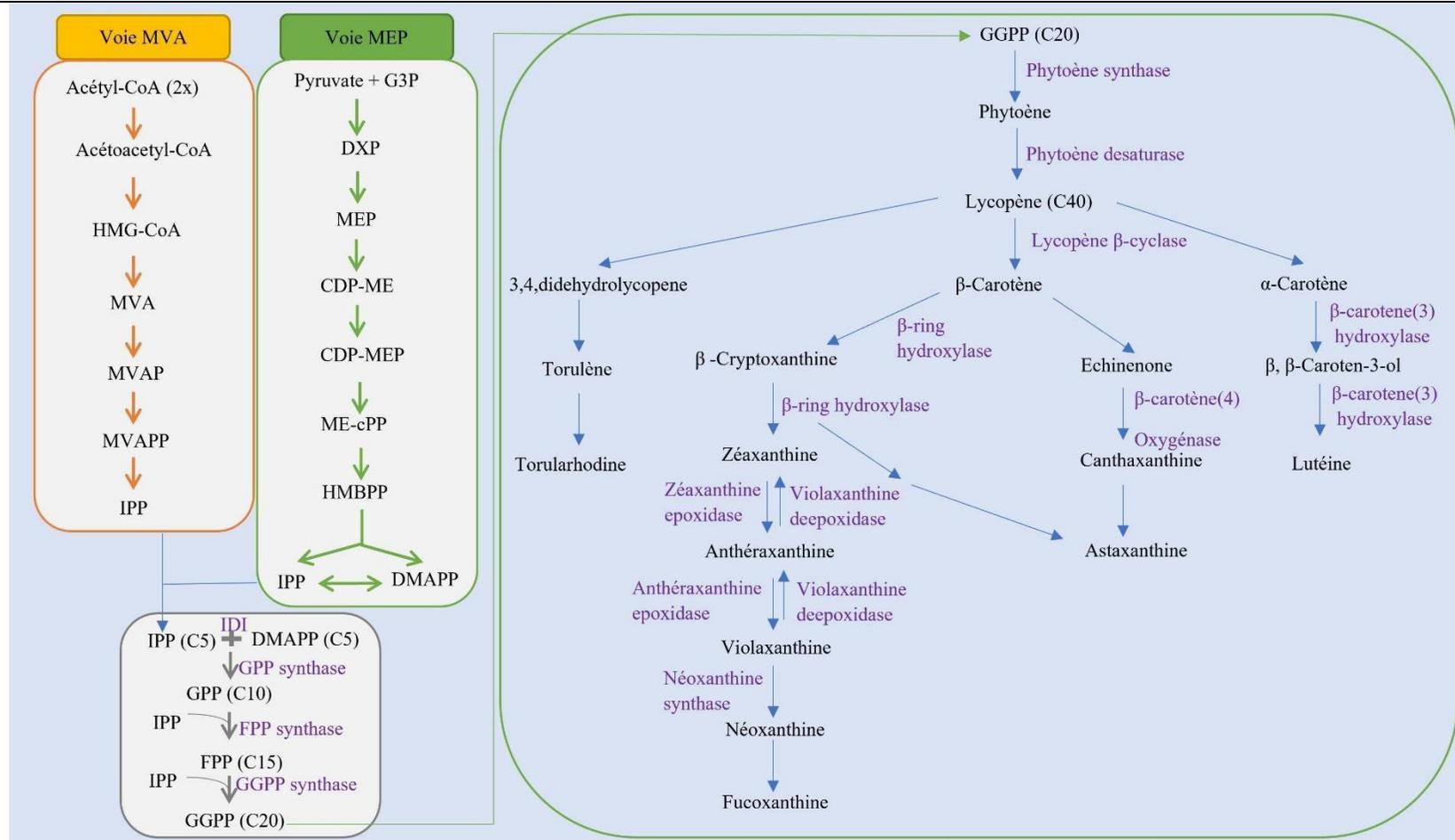


Figure 2 : Représentation des voies de biosynthèse des caroténoïdes par les microalgues inspiré de (Foong et al., 2021; Gupta et al., 2021).
 HMG-CoA: 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA, MVA: Mevalonate, MVAP: Mevalonate-5-phosphate, MVAPP: Mevalonate-5-diphosphate, G3P: Glyceraldehyde 3-phosphate, DXP: 1-déoxy-D-xylose-5-phosphate, MEP: 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate, CDP-ME: 4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-D-érytritol, CDP-MEP: 4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-D-érytritol 2-phosphate, ME-cPP: 2-C-méthyl-D-érythritol-2, 4-cyclodiphosphate, HMBPP: 1-hydroxy-2-méthyl-2-C-butenyl-4-diphosphate, IPP: Isopentenyl pyrophosphate, DMAPP: Diméthylallyl diphosphate, GPP: Geranyl pyrophosphate, FPP: Farnesyl pyrophosphate, GGPP: Geranylgeranyl pyrophosphate, IDI: IPP isomérase. C: atome de carbone.

Les avantages pour la santé des caroténoïdes sont fortement liés à leur absorption et à leur transformation pendant la digestion gastro-intestinale. Il est trouvé que les caroténoïdes naturels sont plus facilement absorbés, car leur présence dans une variété de fruits et légumes facilite leur absorption par le système digestif et leur distribution aux différents tissus du corps (Cervantes-Paz et al., 2016).

Tableau 2 : Tableau comparatif entre les caroténoïdes naturels et synthétiques.

	Caroténoïdes naturels	Caroténoïdes synthétiques
Source	Plantes, levures, bactéries, microalgues	Synthèse chimique
Quantité/Coûts de production	Faible/élevé	Élevée/faible
Bienfaits principaux	Prévention des maladies carcinogènes et cardiovasculaires	Colorant et additif dans l'alimentation animale : des volailles et des poissons
Bio-absorption	Élevée	Faible

3 Généralités sur les microalgues

Les microalgues sont des organismes photosynthétiques, unicellulaires et cosmopolites grâce à leur capacité d'adaptation. Ils sont phototrophes et constituent un groupe très hétérogène physiologiquement et morphologiquement. En milieu aquatique, les microalgues, appelées « phytoplanctons », servent de nourriture à de nombreux organismes, et sont les principaux fixateurs du CO₂ atmosphérique. Le rôle des microalgues est indispensable au maintien des écosystèmes terrestres et dans l'élimination des contaminants présents dans divers environnements. Hormis les avantages écologiques, de nombreuses espèces microalgales présentent un réservoir de biomolécules à haute valeur ajoutée, telles que des pigments, des lipides, des polysaccharides, du bio-hydrogène et même des biopolyesters aux propriétés similaires à celle des plastiques (Koller et al., 2014).

3.1 Biodiversité et classification

Les microalgues peuvent être divisées en deux catégories principales : les procaryotes, qui comprennent des cyanobactéries et les eucaryotes, qui englobent les diatomées, les algues vertes, les algues brunes et les algues rouges. Bien qu'il existe plusieurs critères pour la classification des microalgues, quatre principaux phylums peuvent être distingués en fonction des pigments qu'ils synthétisent : les chlorophytes (algues vertes), les cyanophytes (algues bleue-vertes), les pyrophytes (dinoflagellés rouge-orangés) et les chrysophytes (diatomées et algues brunes dorées) (Mulders et al., 2014) (**Figure 3**).

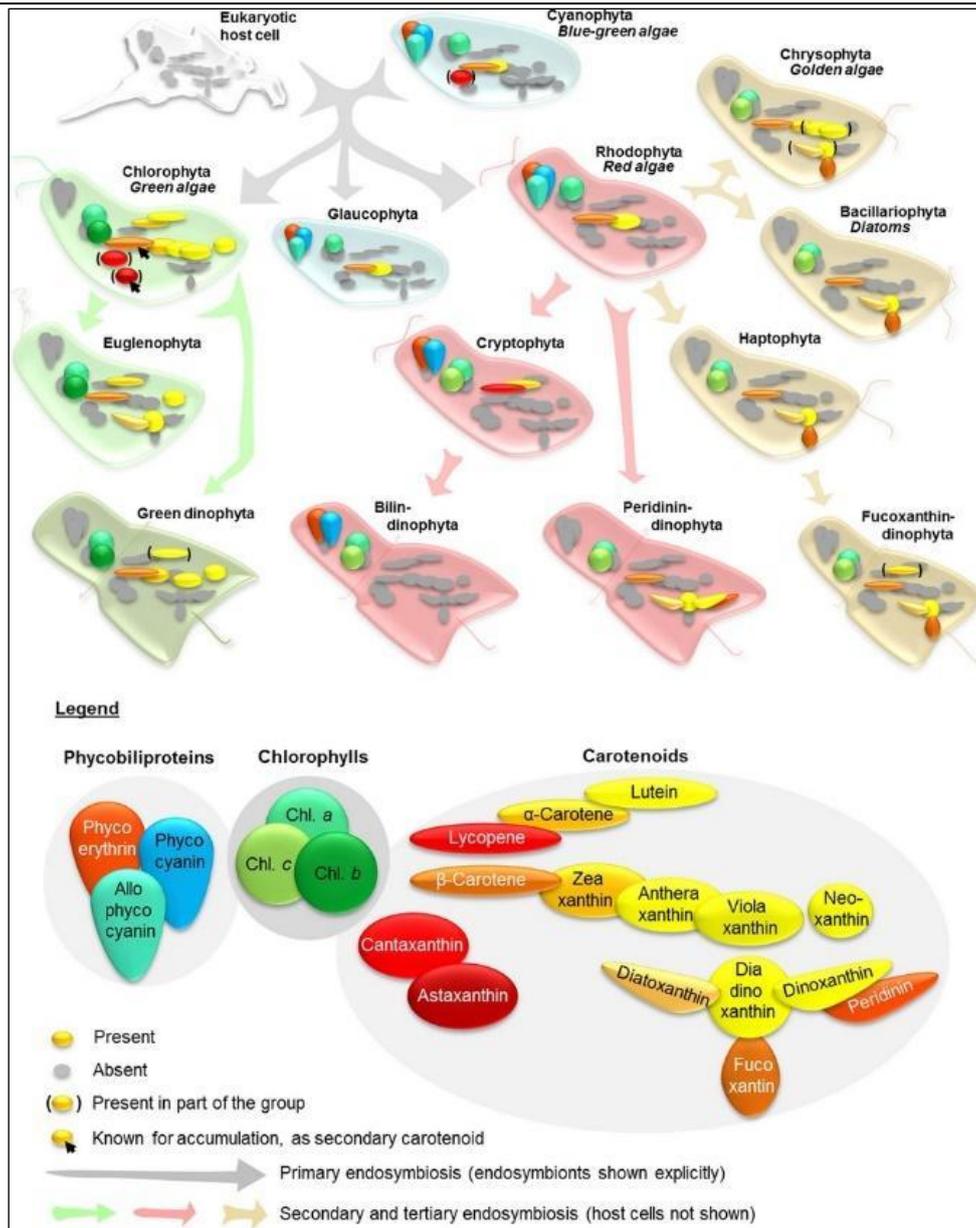


Figure 3 : Phylums des microalgues productrices de pigments d'intérêt (Mulders et al., 2014).

3.2 Structure cellulaire

Les microalgues possèdent une ultrastructure complexe qui comprend divers organites (voir **Figure 4**). La caractérisation cellulaire des microalgues est importante dans les procédés de bioraffinerie des microalgues, elle permet de comprendre leur structure et leur composition, facilitant ainsi la localisation des composants intracellulaires recherchés (Eppink et al., 2019).

3.2.1 Membrane plasmique et paroi cellulaire

Chaque cellule microalgale est séparée de son environnement par une membrane plasmique qui règle ses échanges avec le milieu environnant. Pour renforcer sa protection, une microalgue dispose d'une paroi cellulaire complexe. Cette paroi rigide, structurée en couche, permet à la cellule microalgale de survivre de manière autonome et de résister à des conditions environnementales difficiles.

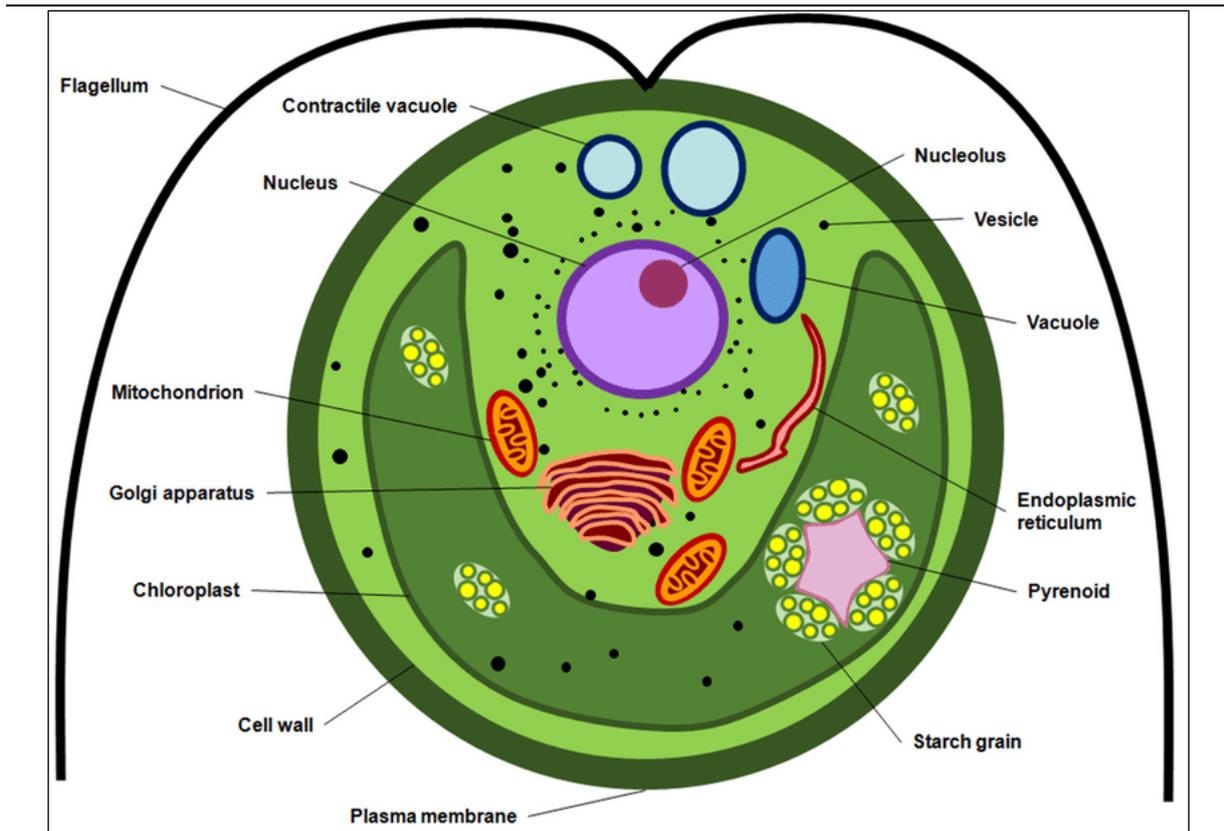


Figure 4 : Organites présents dans une cellule microalgale typique (Poojary et al., 2016).

La paroi cellulaire des microalgues est principalement composée de glycoprotéines et de groupements de sucres, tels que les polysaccharides et la cellulose, formant un réseau rigide et complexe. La composition de la paroi cellulaire peut varier entre les différentes microalgues, représentant entre 11 à 37% de la masse cellulaire totale. Les sucres et protéines de la paroi représentent respectivement 30 à 75% et 1 à 37% de sa composition (S.-K. Kim, 2015; Santos-Ballardo et al., 2016). Le tableau suivant présente la composition en macromolécules des parois extracellulaires de divers groupes de microalgues.

Tableau 3 : Composition des parois extracellulaires et des macromolécules dans divers groupes de microalgues (Santos-Ballardo et al., 2016).

Microalgues	Composants de la paroi
<i>Diatomées</i>	(1,3), (1,4)- β -D-glucane, silice
<i>Phaeophyta</i> (algues brunes)	Cellulose, (1,3), (1,4)- β -D-glucane, protéines arabinogalactane
<i>Rhodophytes</i> (algues rouges)	Cellulose, xylane, mannane, protéines arabinogalactane, lignine
<i>Chlorophytes</i> (algues vertes)	Cellulose, xylane, mannane, xyloglucane, lignin, (1,3), (1,4)- β -D-glucane, alganeane, sporollenine
<i>Chrysophyta</i> (algues dorées)	Cellulose, silice

3.2.2 Cytoplasme et organites cellulaires

Le cytoplasme sert principalement à tenir en suspension les divers organites qui participent au fonctionnement cellulaire, tout comme dans d'autres types de cellules. Les organites cellulaires présents dans une cellule microalgale comprennent le noyau, les mitochondries, les chloroplastes, l'appareil de Golgi, les vacuoles, et le réticulum endoplasmique. Ces organites permettent à la cellule de réaliser divers processus cellulaires, tels que la photosynthèse, l'anabolisme et le catabolisme, la communication intercellulaire et la reproduction. De plus, des vésicules contenant des lipides, des pigments caroténoïdes ou de l'amidon peuvent être stockées dans le cytoplasme cellulaire.

3.2.3 Composition biochimique

La valeur globale de la biomasse algale est déterminée par sa composition biochimique en lipides, glucides et protéines. Les principales classes biochimiques comprennent les lipides (15-60%), les protéines (20-60%) et les polysaccharides (10-50%), qui sont des métabolites primaires essentiels à la survie de la cellule. Les métabolites secondaires, tels que les caroténoïdes (1-14%) et les polyhydroxyalcanoates (PHA), sont des molécules fonctionnelles en relation avec le système physiologique cellulaire (Williams & Laurens, 2010; Calijuri et al., 2022). Le **Tableau 4** ci-dessous présente la composition biochimique des espèces de microalgues couramment employées dans la recherche.

Tableau 4 : Composition biochimique de certaines espèces de microalgues, tableau adapté de (Kandasamy et al., 2022).

Microalgales	Protéines (%)	Glucides (%)	Lipides (%)
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9
<i>Dunaliella sp.</i>	27-57	14-41	6-22
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Nannochloropsis sp.</i>	18-74	7-40	7-48
<i>Haematococcus pluvialis</i>	10-52	34	15-40
<i>Tetraselmis sp.</i>	14-58	12-43	8-33

3.3 Applications et intérêt

Au cours des dernières décennies, les microalgues ont suscité l'intérêt des chercheurs et des industriels en raison de leur potentiel à apporter des solutions durables à des problèmes environnementaux et économiques. À ce jour, parmi les 30 000 espèces de microalgues identifiées, seulement quelques centaines ont fait l'objet d'études approfondies concernant leur composition biochimique et leurs métabolites.

De plus, une dizaine seulement a été cultivée à l'échelle industrielle (Mobin & Alam, 2017). Les microalgues et leurs produits dérivés sont utilisés dans diverses applications, notamment dans les secteurs alimentaire, pharmaceutique, cosmétique, aquacole et dans le domaine de la bioénergie. (voir Figure 5).

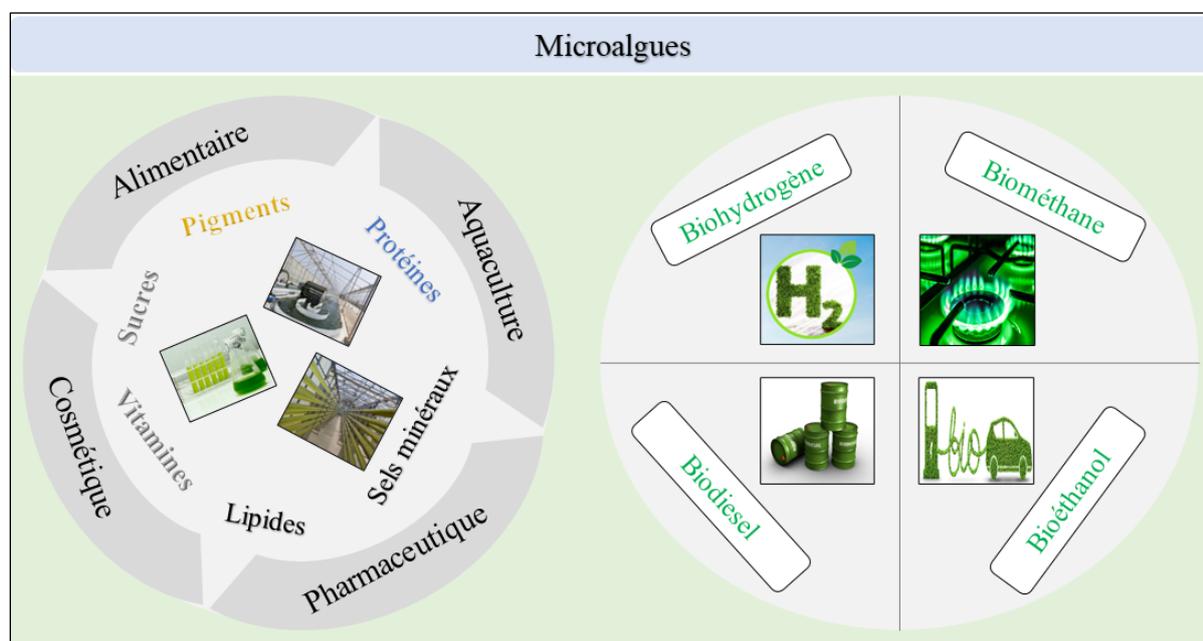


Figure 5 : Différentes utilisations des microalgues et de leurs produits dérivés.

3.3.1 Nutrition humaine et application en cosmétique

Parmi les microalgues couramment utilisées pour la consommation humaine, *Arthrospira* et *Chlorella*, sont reconnues pour leur teneur élevée en protéines. De plus, certaines microalgues, comme *Arthrospira platensis* sont capables d'accumuler des lipides bénéfiques pour la santé humaine, offrant ainsi une alternative viable aux acides gras polyinsaturés provenant des poissons, tels que l'acide oléique et l'acide linoléique. Pour les caroténoïdes, *Dunaliella salina* et *Haematococcus pluvialis*, particulièrement riches en astaxanthine et en bêta-carotène, trouvent une large application. Ces pigments naturels peuvent être utilisés comme complément alimentaire, additif alimentaire, agent de photoprotection pour la peau dans les crèmes solaires, comme décrit dans le **Tableau 1** (Nazih & Bard, 2018; Vaz et al., 2016).

3.3.2 Nutrition animale et aquaculture

Les microalgues sont intégrées dans l'alimentation animale en tant que source riche en acide gras polyinsaturés, en protéines, en vitamines et en pigments. Les biomasses dégraissées de *Chlorella* et de *Arthrospira*, issues de la production de biocarburants représentent une source nutritive précieuse pour l'alimentation des volailles (Lum et al., 2013; Świątkiewicz et al., 2015). En aquaculture, les microalgues jouent un rôle nutritionnel essentiel pour les animaux marins, servant d'aliments vivants pour certains mollusques, crustacés, certaines espèces de poissons et zooplanctons (Kaparapu, 2018). Les microalgues, grâce à leur teneur en protéines, lipides, et en caroténoïdes, sont également utilisés comme compléments ou additifs alimentaires pour remplacer la farine et l'huile de poisson en aquaculture (Shah et al., 2018).

Pour les applications en nutrition humaines et animale, des données récentes mettent en lumière la production annuelle, ainsi que les entreprises et pays producteurs des quatre principales microalgues, largement exploitées : *Chlorella sp.*, *Dunaliella salina* et *Haematococcus pluvialis*, elles sont présentées dans le **Tableau 5**.

Tableau 5 : Production annuelle, entreprises et pays producteurs des trois principales microalgues : *Chlorella sp.*, *D.salina* et *H.pluvialis* (Olabi et al., 2023).

Microalgues	Production annuelle (Masse sèche)	Pays producteur/entreprise	Applications
<i>Chlorella sp.</i>	2000 tonnes	Allemagne, Taiwan, Japan	Nutrition humaine et aquaculture
<i>D.salina</i>	1200 tonnes	Australie, Israël, USA, Japan/BASF et Solazyme	Nutrition humaine
<i>H. pluvialis</i>	300 tonnes	USA, Inde, Israël/Fuji chemicals, Cyanotech	Nutrition humaine et aquaculture

3.3.3 Production de biocarburants

Les microalgues, en raison de leur teneur élevée en lipides et glucides et de leur croissance rapide, sont perçues comme une ressource intéressante pour la production de biodiesel, de bioéthanol ou de bioplastiques. En effet, certaines espèces ont la capacité de produire des lipides, qui peuvent être convertis en biodiesel. Elles peuvent également produire de l'amidon, qui peut être converti en bioéthanol, et des polyhydroxyalcanoate (PHA), des polymères biodégradables utilisés dans la production de bioplastiques (B. Williams & L. Laurens, 2010).

4 Les microalgues productrices de caroténoïdes d'intérêt

4.1 Microalgues mésophiles

4.1.1 Haematococcus pluvialis

Haematococcus pluvialis est une microalgue verte unicellulaire qui se trouve principalement dans les eaux douces. Elle appartient à la classe des *Chlorophycées*, à l'ordre des *Chlamydomonadales*, à la famille d'*Haematococcaceae* et au genre d'*Haematococcus* (Kobayashi, 2003). Cette microalgue a une température optimale de croissance entre 25 °C et 28 °C. Elle est considérée comme une source riche d'astaxanthine, qui peut représenter de 4 à 7% de sa matière sèche totale (Fan et al., 1994; Jannel et al., 2020). Le cycle de vie d'*H. pluvialis* est complexe et comprend deux stades principaux :

- Le stade mobile, où les cellules sont biflagellées (zoospores), sphériques ou en forme de poire avec une taille de 10 à 20 µm.
- Le stade immobile, qui comprend les formes de palmella et d'aplanospores, où les cellules sont sphériques et leur taille varie entre 30 et 60 µm.

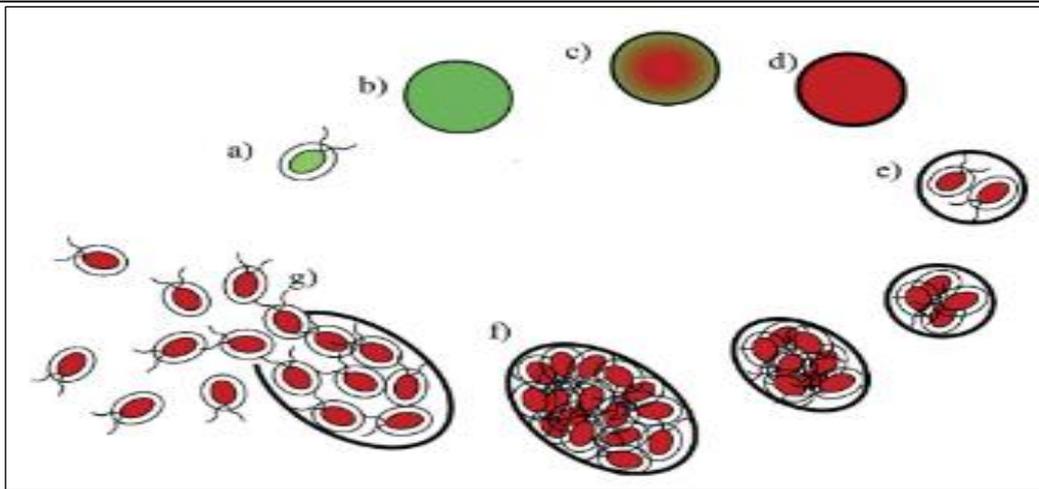


Figure 6 : Les stades cellulaires de la microalgue *H.pluvialis* (Marinho et al., 2021). a) zoospores, b) palmela, c) palmela en transition vers les aplanospores, d) aplanospores rouge, e) sporangiums, f) sporangium au stade final, g) zoospores relargués.

Au cours de son cycle de vie, *H.pluvialis* développe une diversité de morphologies cellulaires lors de la différenciation cellulaire (enkystement et germination) et de la maturation (synthèse d'astaxanthine) (voir la **Figure 6**). Ces changements morphologiques s'accompagnent également d'une modification de la structure de ses parois cellulaires (Bauer & Minceva, 2019; Grujić et al., 2022; Kobayashi et al., 1997; Marinho et al., 2021).

Au stade de l'enkystement, la microalgue *H.pluvialis* est capable de développer une paroi cellulaire d'une épaisseur variant de 1,8 à 2,2 μm , et d'une complexité structurale remarquable se manifestant avec une paroi trilaminaire. Cette caractéristique rend l'extraction de l'astaxanthine et d'autres molécules intracellulaires particulièrement difficile.

La paroi cellulaire subit cinq stades de développement, allant de l'état flagellé à l'état enkysté. Au cours de ce développement, les cellules se dotent d'une paroi primaire, puis d'une paroi secondaire principalement composée de mannane. Ensuite, elles développent une couche cristalline tripartite, suivie d'une gaine trilaminaire contenant l'algaenan. Enfin, les différentes couches de la matrice extracellulaire se forment (Spain & Funk, 2022; Wayama et al., 2013).

La microalgue *H.pluvialis*, présente une phase de caroténogénèse, qui est un mode de survie cellulaire très organisé, avec deux voies de synthèses possibles, celle du MEP ou du MVA. Au cours de cette phase, les cellules démontrent une capacité d'adaptation physiologique et morphologique. La caroténogénèse est déclenchée par l'exposition à des facteurs de stress abiotiques, seuls ou en combinaison, dans l'environnement de la microalgue. Durant une période de stress, la cellule débute la synthèse de molécules photo-protectrices, notamment l'astaxanthine, en association avec des lipides. Initialement, l'astaxanthine synthétisée se localise autour du noyau avant de se répartir dans l'ensemble du protoplaste. Cette distribution suggère que la priorité en situation de stress est de protéger d'abord le matériel génétique, puis le reste de la cellule contre tout dommage photo-induit. L'astaxanthine agit comme un filtre contre l'excès lumineux, contribuant à la protection de l'appareil photosynthétique et la neutralisation des radicaux libres (Harker et al., 1996).

4.1.2 *Dunaliella salina*

Dunaliella salina, et les autres espèces du même genre, sont des microalgues vertes unicellulaires qui dominent les écosystèmes à haute salinité, qu'ils soient naturels ou de grande échelle industrielle. *Dunaliella* appartient à la classe des *Chlorophycées*, à l'ordre des *Chlamydomonadales*, à la famille de *Dunaliellaceae* et au genre *Dunaliella*. Ces microalgues se distinguent par leur capacité à se développer de manière optimale dans des environnements salins, avec une concentration en sel de 10 à 15% (m/m) de sel. La croissance de *D.salina* est optimale à des températures de 21 °C à 26 °C dans un environnement naturel. Cette espèce représente une source abondante en bêta-carotène, pouvant atteindre jusqu'à 14% de sa matière sèche totale. Ce caroténoïde est produit lorsque les cellules sont exposées à des conditions environnementales stressantes (Gómez & González, 2005; Harvey & Ben-Amotz, 2020).

D. salina libère des zoospores vertes biflagellées présentant diverses formes, mais généralement ovales ou en forme de poire. En réponse au stress, ces zoospores se transforment en cellules matures dotées des globules cytoplasmiques oranges (**Figure 7**). Ces cellules matures, qui conservent leurs flagelles, mesurent entre 20 et 30 µm de long et 12 µm de large (Polle et al., 2020). À la différence de la majorité des autres microalgues, *Dunaliella* est dépourvue de paroi cellulosique rigide, ce qui la rend facilement digestible par les humains et les animaux, et facilite l'extraction de ses composés intracellulaires (Sui & Vlaeminck, 2020).

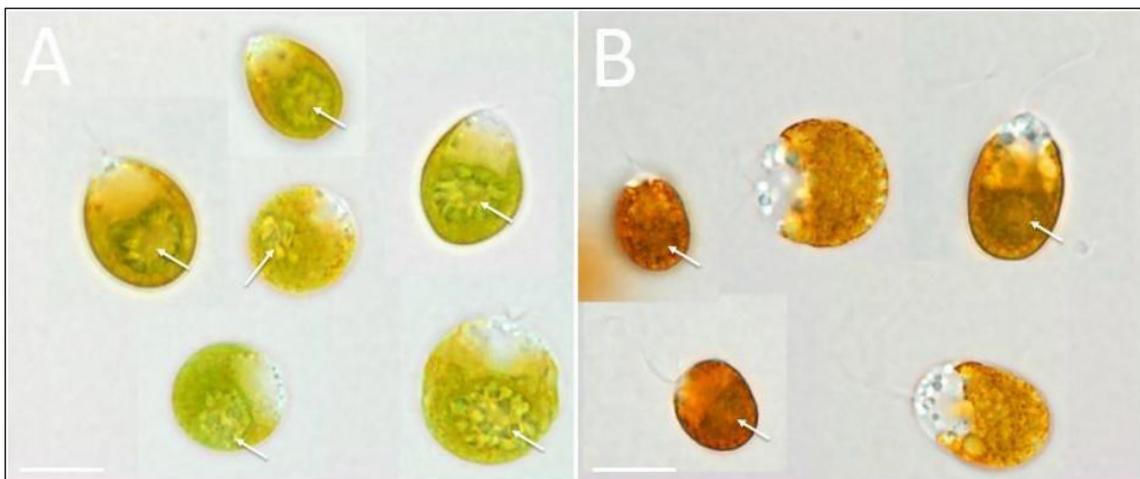


Figure 7 : Cellules d'une souche de *D. salina* (CCAP 19/18) observées au microscope optique par Polle et al., (2020). **A**) cellules vertes, **B**) cellules oranges. Les flèches indiquent les pyrénoides.

Les espèces *D. salina* et *D. bardawil* ont la capacité d'accumuler le bêta-carotène lorsqu'elles s'adaptent à des conditions de forte intensité lumineuse ou à une privation de nutriments tels que l'azote, le phosphate ou le sulfate. La biosynthèse du bêta-carotène s'initie par la voie du MEP, qui conduit à la production du phytoène. Ce dernier est ensuite converti en bêta-carotène sous l'action d'enzymes localisées dans les membranes des chloroplastes et est accumulé au sein de structures appelées plastoglobulines. Le bêta-carotène produit joue un rôle protecteur pour les cellules en neutralisant la production élevée de radicaux libres oxygénés (Pick et al., 2019; Zarandi-Miandoab et al., 2019).

4.1.3 *Chlorella zofingiensis*

La microalgue *Chlorella zofingiensis*, précédemment connue par *Chromochloris zofingiensis*, est capable de survivre dans des environnements d'eau douce ou salée. Elle est classée parmi les *Chlorophycées*, dans l'ordre des *Sphaeropleales*, la famille des *Chromochloridaceae* et le genre de *Chromochloris*. L'espèce *C.zofingiensis* peut croître de manière optimale entre 20 °C et 30 °C. Elle est caractérisée par des cellules sphériques immobiles, dont le diamètre varie entre 2 et 15 µm (Gorgich et al., 2021).

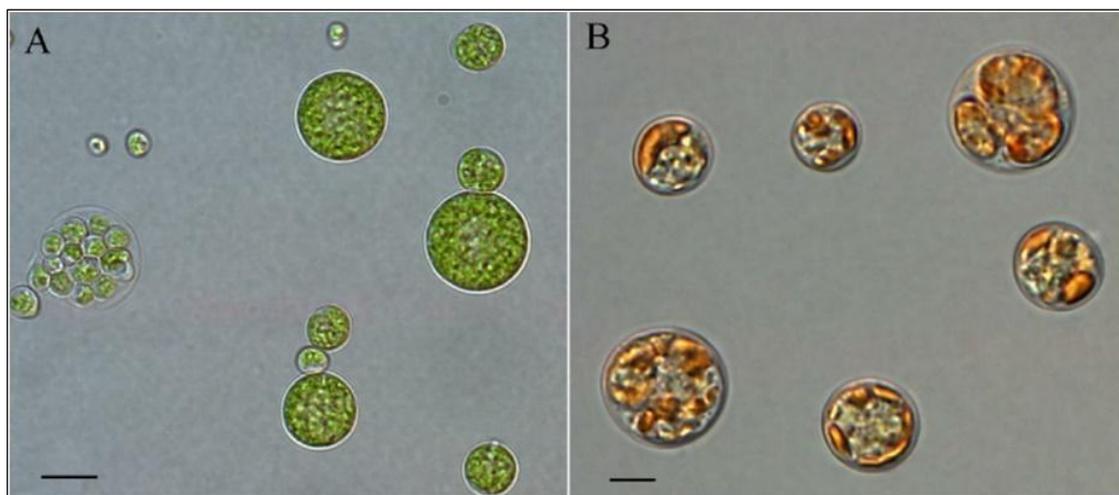


Figure 8 : Morphologie des cellules de la microalgue *Chlorella zofingiensis*. A) cellules vertes, B) cellules rouges. Échelle de 5 µm. Photographie de (Gorgich et al., 2021).

C.zofingiensis est reconnue pour sa capacité à accumuler de l'astaxanthine et de la canthaxanthine en réponse à diverses conditions de stress abiotiques, comme une forte irradiation, un apport limité en azote ou un stress salin (Liu et al., 2011; Pelah et al., 2004).

La production commence par la conversion du bêta-carotène en échinénone, qui est ensuite transformé en canthaxanthine, puis en adonirubine et enfin en astaxanthine. Cela est catalysé par deux enzymes : la bêta-caroténoïde kétolase et la bêta-caroténoïde hydroxylase.

L'astaxanthine produit est progressivement accumulé dans des corps lipidiques situés à l'extérieur des chloroplastes. L'astaxanthine joue un rôle crucial en tant que filtre photo protecteur pour les composants cellulaires contre la forte irradiation. Elle prévient également l'accumulation de radicaux libres oxygénés et agit comme une barrière hydrophobe pour prévenir la perte d'eau lors d'un stress hydrique ou salin (Gorgich et al., 2021).

4.2 *Microalgues psychrophiles et psychrotolérantes*

4.2.1 Environnement naturel d'origine

Dans les régions polaires et alpines, où le climat est rigoureusement froid, les microalgues extrémophiles sont identifiées comme étant à l'origine de la pigmentation distincte de la couverture neigeuse. Ces microorganismes sont en effet responsables des teintes rouges, oranges, jaunes ou brunes, qui sont fréquemment observées pendant la saison de dégel, lorsque les champs de neige commencent à fondre (**Figure 9**).

Face à des conditions environnementales défavorables, ces microalgues ont développé des mécanismes de survie sophistiqués. Elles ont réussi à s'adapter à des températures extrêmement basses, allant jusqu'à 0 °C, malgré une disponibilité limitée de sources de nutriments. Leur résilience exceptionnelle souligne leur importance dans l'étude des écosystèmes extrêmes et le potentiel qu'elles offrent pour la recherche. En effet, les microalgues adaptées au froid, notamment celles de la région arctique, jouent un rôle essentiel. Elles contribuent à la réduction des phénomènes d'albédo et accélèrent la fonte des glaciers avec leurs floraisons. Par conséquent, elles constituent un facteur déterminant dans la surveillance et la compréhension du changement climatique (Fogg & Smith, 1997; Hoham, 1975; Lutz et al., 2015).

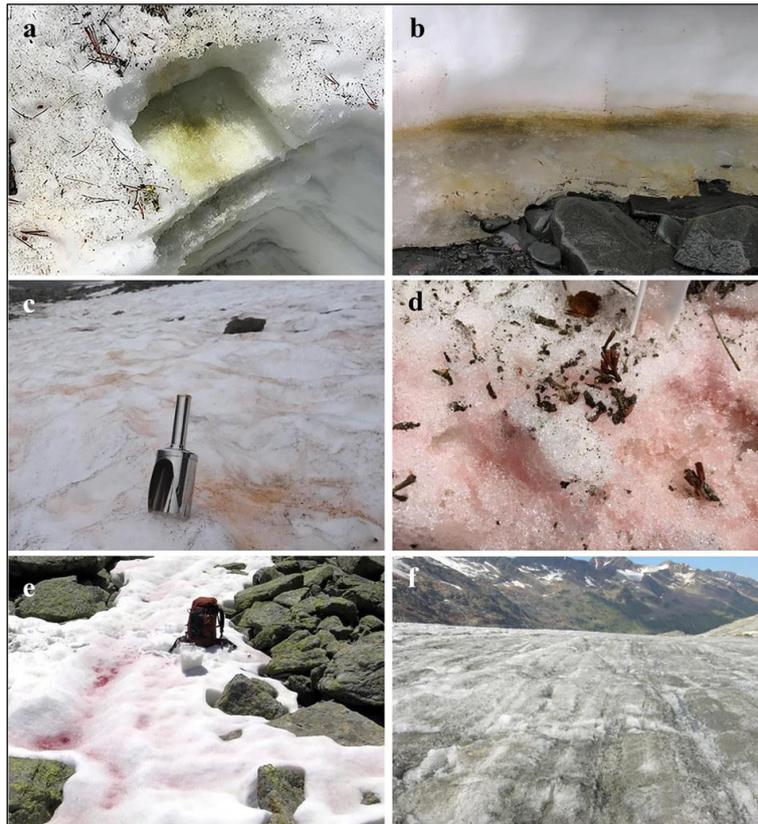


Figure 9 : Photographies de champs de neiges de différentes teintes causées par des microalgues. (a) Neige verte *Chloromonas brevispina*, (b) Neige brune dorée, *Hydrurus sp.* (c) Neige orange, *Sanguina aurantia* (d) Neige rose, *Chlainomonas kolii* (e) Neige rouge, *Sanguina nivaloides* (f) Glacier gris, *Mesotaenium berggrenii* (Hoham & Remias, 2020).

Ces microalgues peuvent être classées en deux catégories : les microalgues psychrophiles avec une température de croissance optimale inférieure à 15 °C et une limite supérieure de survie à 20°C ; et les microalgues psychrotolérantes capables de croître à basse température, mais avec une température de croissance optimale supérieure à 15°C et une capacité de survie au dessus de 20°C. Par ailleurs, les expressions « microalgues de champs de neige » et « microalgues de pergélisol » sont dérivées des habitats spécifiques où les souches ont été découvertes. Le terme « champs de neige » désigne les microalgues isolées à partir de plaques de neige, alors que « pergélisol » est plutôt utilisé pour les microalgues qui se trouvent dans les couches denses de sol, enfouies sous la surface des régions polaires (Cvetkovska et al., 2017; Hoham, 1975).

4.2.2 Mode de vie des microalgues de neiges

Le mode de vie des microalgues de neige, fortement rythmé par les saisons, se distinguent par deux périodes principales, chacune caractérisée par des formes cellulaires distinctes. Durant l'hiver, les spores sphériques rouges survivent enfouies sous la neige. Avec l'arrivée du printemps ou du début de l'été, une période marquée par la fonte de neige et des glaciers, les microalgues se développent sous forme de cellules végétatives vertes et mobiles dans la neige fondante. À la fin de l'été, lorsque la neige disparaît, les cellules se déshydratent et sont exposées à la lumière directe du soleil. Par conséquent, ces microorganismes sont contraints de s'adapter à des conditions extrêmes : une irradiation élevée, la dessiccation, une restriction en nutriments, et surtout, une température très basse (Remias et al., 2005).

Malgré une exposition limitée à la lumière, les microalgues de neiges parviennent à maintenir une activité photosynthétique efficace. Ceci est rendu possible grâce à des mécanismes moléculaires spécifiques qui favorisent l'adaptation à la photosynthèse à basse température. Ces mécanismes se caractérisent par des taux élevés de transfert d'électrons de Q_A à Q_B , une étape fondamentale de la photosynthèse. Ce processus, qui implique le transfert d'électrons à travers une série de molécules situées dans les membranes des thylakoïdes des chloroplastes, est essentiel pour la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique. Cela permet aux organismes photosynthétiques de survivre et de prospérer malgré les conditions de faible température. En ce qui concerne la nutrition, les microalgues de neige peuvent utiliser de nombreuses sources de nutriments. Les dépôts atmosphériques peuvent apporter de l'azote et du phosphore, tandis que les cendres volcaniques, riches en nutriments, et les minéraux des roches locales, riches en azote, phosphore, fer et manganèse, constituent d'autres sources potentielles. Les nutriments dissous dans la neige, les débris rocheux et la faune maritime peuvent également contribuer à leur apport nutritionnel (Hoham & Remias, 2020).

Face à ces changements environnementaux, ces microalgues ajustent leurs caractéristiques internes pour assurer leur survie. Lorsqu'elles sont soumises à une période de stress, qui peut défavoriser leur croissance, elles déclenchent un mécanisme de photoprotection. Cette activité cellulaire implique une adaptation de leur morphologie et de leur physiologie pour résister aux conditions défavorables. L'adaptation morphologique se manifeste par l'enkystement des cellules, c'est-à-dire une transition vers des formes cellulaires plus robustes, appelées kystes ou spores, qui sont dotées de parois protectrices renforcées. Le métabolisme interne se réoriente donc vers la biosynthèse de métabolites secondaires en réponse au stress, en particulier les lipides, les caroténoïdes et les composés phénoliques. Ces métabolites jouent un rôle déterminant dans le mécanisme de survie des cellules : les acides gras polyinsaturés maintiennent la fluidité membranaire des chloroplastes essentielle au transfert des électrons, tandis que les caroténoïdes secondaires, notamment l'astaxanthine et ses intermédiaires, protègent l'appareil photosynthétique en absorbant l'excès de la lumière et en neutralisant les radicaux libres, une fonction également assurée par les composés phénoliques (flavonoïdes). Ces adaptations permettent de survivre au stress jusqu'au retour de conditions plus favorables (Duval et al., 1999; Leya, 2013; Remias, 2012; Řezanka et al., 2013).

4.2.3 Souches, forme et caractéristiques cellulaires

Ces microalgues appartiennent principalement aux genres *Chloromonas*, *Chlamydomonas* et *Chlainomonas* (Chlorophycées). Parmi elles, *Chlamydomonas nivalis*, réputée pour sa richesse en astaxanthine, est une espèce de chlorophycée de l'ordre des Volvocales. Cette microalgue prospère notamment dans les hautes altitudes et les zones fortement exposées aux irradiations solaires. Les spores enkystées de *Chlamydomonas nivalis* peuvent être localisées près de la surface de l'interface neige-air, voire jusqu'à 10 cm de profondeur dans la neige. La majeure partie de leur cycle de vie se déroule sous cette forme résistante, car les formes flagellées ne sont pas adaptées pour se déplacer dans la couche de neige afin de répondre aux exigences de lumière et de température (Painter et al., 2001; Remias et al., 2005).

Au stade végétatif, les cellules adoptent une forme ellipsoïdale ou ovale, avec deux flagelles identiques, mesurant entre 15 et 20 μm de longueur. Elles possèdent un seul grand chloroplaste central qui entoure les granules d'amidon, un pyrénoloïde riche en enzymes, une forte teneur en caroténoïdes primaires, et une paroi fine d'une épaisseur de 0,1 à 0,5 μm avec une couche externe d'épaisseur variable (0,02-0,06 μm). Les spores qui sont rouges, ont une taille comprise entre 17 et 43 μm , et sont dotées d'une paroi d'une épaisseur de 0,3 à 0,4 μm . La paroi cellulaire facilite l'adhésion de substances inorganiques, organiques et des microorganismes tels que les bactéries et les champignons, connus sous le nom de cryoconites (Remias et al., 2005).

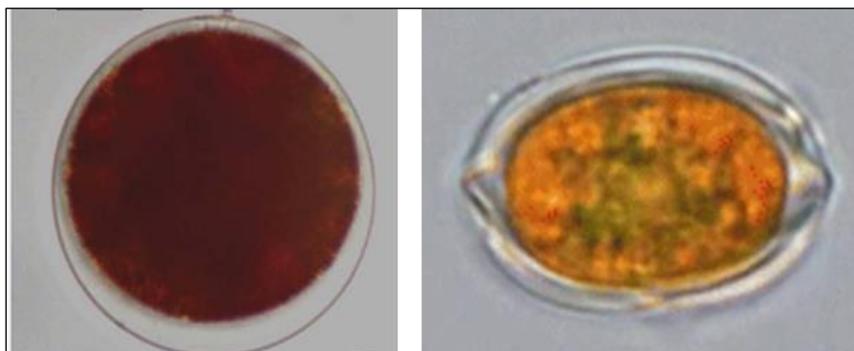


Figure 10 : Observation au microscope optique d'un spore de *Chlainomonas nivalis* (à gauche) et de *Chloromonas nivalis* (à droite) (Procházková et al., 2018; Remias et al., 2010).

La souche *Chlainomonas sp.*, proche de *Chlamydomonas nivalis*, est trouvée en abondance dans les Alpes autrichiennes. Elle est à l'origine de la floraison annuelle observée dans les lacs. Leurs spores rouges, sphériques et immobiles, sont composées d'une gaine trilaminaire entourée d'une ou plusieurs couches de matrice extracellulaire. Leur teneur en caroténoïdes secondaires, principalement de l'astaxanthine, atteint jusqu'à 93% des pigments présents. Cependant, *Chlainomonas sp.* se distingue par sa capacité à accumuler l'astaxanthine principalement sous forme de diester, tandis que la forme monoester est prédominante chez *Chlamydomonas nivalis* et *Chloromonas nivalis* (Procházková et al., 2018; Řezanka et al., 2013). De plus, *Chlainomonas sp.* présente des niveaux élevés d'acides gras polyinsaturés (AGPI), notamment l'acide alpha-linolénique. Ces niveaux sont comparables à ceux des spores rouges de *Chlamydomonas nivalis* trouvée dans le même habitat. En revanche, les acides stéaridonique et linoléique sont les plus abondants chez les espèces de *Chloromonas* (Procházková et al., 2018).

4.2.4 Biosynthèse des lipides et des caroténoïdes secondaires

Les études conduites sur certaines microalgues de neiges, ont généralement porté sur l'étude de leur origine, leur classification, ainsi que leur forme et structure cellulaire. Toutefois, nonobstant le nombre limité de ces microalgues cultivées en laboratoire pour une étude approfondie de la croissance et la synthèse de l'astaxanthine et ses dérivés, ainsi que des lipides, leur potentiel en biotechnologie a été fortement mis en avant (Varshney et al., 2015).

Dans une étude intéressante menée par Hulatt et al., (2017), le potentiel des microalgues polaires pour la production de biomasse et de lipides à basse température a été mis en évidence. L'étude a examiné la croissance et la production de lipides de cinq espèces de microalgues de neige/sol originaires de Svalbard en Norvège. Ces espèces comprenaient *Chlamydomonas klinobasis* CCCryo 050-99, *Chlamydomonas pulsatilla* CCCryo 002b-99, *Chloromonas cf. platystigma* CCCryo 020-99, *Raphidonema cf. sempervirens* CCCryo 011a-99, et *cf. Macrochloris rubrioleum* CCCryo 194-04. La culture a été réalisée en mode batch à une température de 6 °C dans un photobioréacteur de 350 mL, avec une intensité lumineuse de 135 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. La productivité obtenue était de 0,63 g/L/j. Après 20 jours de culture, sous une intensité lumineuse augmentée à 230 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, les lipides totaux représentaient 28 à 39% de matière sèche. Les espèces étudiées ont principalement accumulé des chaînes d'acides gras insaturés dans les lipides neutres, en particulier des acides gras polyinsaturés de la série C16, C18:1n-9 et C18:3n-3.

En complément à cela, une autre souche psychrophile appelée *Coelastrella terrestris*, collectée à partir de mucilage rouge dans une zone de fonte de glacier en Islande, a été cultivée pour étudier son potentiel de production des caroténoïdes secondaires. La culture a été réalisée dans du milieu BBM à une température de 15 °C et une intensité lumineuse de 30-40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Par la suite, ces paramètres ont augmenté à 20 °C et 170 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ lors de la mise en échelle à 1,25 L de culture en photobioréacteurs. Le meilleur taux de croissance en phase verte a été de 0,34 j⁻¹. Ensuite, sous une limitation en azote, un maximum de 1,96 mg/L d'adonixanthine, sous formes libres et estérifiées, a été obtenu. Cette étude a souligné le potentiel significatif de la souche psychrophile en tant que source de caroténoïdes à haute valeur ajoutée dans des conditions de culture optimisées (Doppler et al., 2022).

Enfin, dans l'étude menée par Leya et al., (2009), de nombreuses autres souches de microalgues de neige/sol ont été étudiées pour leur potentiel de production de caroténoïdes après leur culture en croissance et en stress. Ces recherches cumulatives mettent en évidence le potentiel significatif des microalgues de neige pour la production de biomasse et de lipides à basse température, ainsi que pour la production de caroténoïdes à haute valeur ajoutée.

4.3 Stratégies d'induction de la synthèse des caroténoïdes secondaires

La culture de microalgues, notamment *H.pluvialis*, *D.salina* et *C.zofingiensis* qui produisent des caroténoïdes secondaires, se déroule en deux phases : verte et rouge. Pendant la première phase, plusieurs facteurs clés influencent la croissance et la production de biomasse. Ces facteurs comprennent la température, l'apport en nutriments, la salinité et l'intensité lumineuse.

En général, la synthèse des caroténoïdes secondaires est induite dans une seconde phase, après la phase de croissance. Elle peut être provoquée de différentes manières, comme une limitation en azote ou en phosphore, une variation de l'intensité lumineuse, une modification de la concentration saline ou une augmentation de l'intensité lumineuse (voir **Tableau 6**). Pour chaque microalgue, les conditions de stress sont soigneusement ajustées afin de stimuler la caroténogénèse (Oslan et al., 2021).

4.3.1 Effet de la carence en nutriments

L'azote et le phosphore sont des nutriments essentiels pour la croissance de microalgues. Chez *H.pluvialis*, *D.salina* et *C.zofingiensis*, une limitation d'un seul de ces nutriments ou une combinaison de plusieurs d'entre eux peut induire des réponses variées en termes de production de caroténoïdes secondaires.

L'azote est un macronutriment vital, jouant un rôle majeur dans la synthèse de matériel génétique, de protéines, de lipides et de carbohydrates. Il représente 1 à 10% de la biomasse algale totale. Ce macronutriment peut être assimilé par les microalgues sous diverses formes, notamment le nitrate, le nitrite et l'ammonium.

Pour le phosphore, bien qu'il représente moins de 1% de la biomasse algale, il est un composant essentiel pour la croissance et le développement des microalgues. En absence de phosphore, la photosynthèse est réprimée, ce qui affecte ainsi la croissance et le métabolisme cellulaire des microalgues (J. Fan et al., 2014).

Une limitation en azote a été validée comme le stress approprié pour stimuler l'augmentation de la production des lipides, ainsi que des caroténoïdes, notamment l'astaxanthine et le bêta-carotène. (Imamoglu et al., 2009; Minhas et al., 2016; Yaakob et al., 2021) ont observé que lorsque l'azote est limité dans le milieu de culture d'*H.pluvialis*, la production d'astaxanthine augmente, en particulier en présence d'une forte intensité lumineuse de 546 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ à une température de 25 °C. Cette augmentation a été observée dans l'eau distillée enrichie en CO_2 et dans le milieu Rudic dépourvu d'azote, avec des valeurs respectives d'astaxanthine de 29,62 et 30,07 mg/g. Selon les résultats de Rise et al., (1994), chez *C.zofingiensis*, une accumulation maximale de caroténoïdes secondaires (70% d'astaxanthine et 30% de canthaxanthine) a été observée dans les cellules privées d'azote et cultivées à une intensité lumineuse de 300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Par contre, selon (Lv et al., 2016), la production du bêta-carotène par la microalgue *D.salina* a été élevée lorsque les cellules ont été soumises à une combinaison de carence azote, phosphore et soufre, comparativement à une privation d'un seul nutriment. Cela indique que, selon la microalgue considérée, une carence en un seul nutriment ou une combinaison de plusieurs d'entre eux peut entraîner des variations dans la production de caroténoïdes ciblés.

4.3.2 Effet de la température

La température a un impact significatif sur l'accumulation des caroténoïdes, notamment l'astaxanthine chez *H.pluvialis* et *C.zofingiensis*, et le bêta-carotène chez *D.salina*. Une élévation de température provoque une accumulation de caroténoïdes de stress, due à l'augmentation du stress photo oxydatif.

Selon (Del Campo et al., 2004; García-González et al., 2005), une température élevée (28-30 °C) a été identifiée comme le seul facteur augmentant la production de lutéine, sans affecter la production d'astaxanthine et de bêta-carotène. Par conséquent, il est suggéré de cultiver *H.pluvialis*, *C.zofingiensis* et *D.salina* à une température élevée de 25-30 °C, en combinaison avec d'autres facteurs de stress, tels que la lumière et la salinité, pour une efficacité accrue (Gorgich et al., 2021).

4.3.3 Effet de l'intensité lumineuse

L'intensité lumineuse et la durée d'exposition ont un impact significatif sur l'induction de la synthèse des caroténoïdes de stress chez diverses espèces de microalgues. L'intensité lumineuse optimale pour la production de bêta-carotène par *D.salina* a été identifiée à 1500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Cette intensité a permis d'atteindre 2,3 mg/L/j, comme l'ont rapporté (Maltsev et al., 2021).

(Pelah et al., 2004) ont observé que chez *C.zofingiensis*, une forte intensité lumineuse de 300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ est nécessaire pour provoquer l'accumulation maximale d'astaxanthine (5,32 mg/g MS). Cependant, cette intensité n'est pas nécessaire pour provoquer l'accumulation maximale de canthaxanthine. Sa diminution à 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ et en combinaison avec le stress salin à 2% de NaCl, permet d'atteindre une teneur maximale de canthaxanthine de 8,5 mg/g MS.

Chez la microalgue *H.pluvialis*, il a été observé que le stress sous forme d'une augmentation de l'intensité lumineuse favorise l'accumulation de l'astaxanthine (Schoefs et al., 2001). Cette microalgue a montré une plus forte production d'astaxanthine lorsqu'une forte intensité lumineuse de 400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ a été combinée avec une limitation en azote (HL-N), atteignant 306,63 $\mu\text{g}/\text{mL}$, comparativement à 200,53 $\mu\text{g}/\text{mL}$ avec seulement une forte intensité lumineuse et 97,08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ avec seulement une limitation en azote. En effet, la réponse phytoprotectrice est rapide lorsqu'on combine ces facteurs, ce qui permet d'empêcher les dommages au photosystème II, comme déterminé par Scibilia et al., (2015).

4.3.4 Effet de la salinité

Certaines microalgues sont capables de s'adapter à des environnements plus ou moins salins. Elles ajustent constamment leur teneur en glycérol qui leur permet de maintenir l'équilibre hydrique de leurs cellules. Par conséquent, la salinité a un impact sur la croissance des microalgues et la production de caroténoïdes. Par exemple, la concentration d'astaxanthine augmente lorsque les microalgues *H.pluvialis* et *C.zofingiensis* sont soumises à un stress salin. *H.pluvialis* peut tolérer une concentration maximale de sel de 10% w/v. D'autre part, les espèces de *Dunaliella*, *D. salina* et *D. bardawil*, sont halotolérantes et peuvent s'adapter à une large gamme de concentration en sel, allant de moins de 100 mM à des solutions saturées de 5,5 M de NaCl (Pick et al., 2019).

4.3.5 Culture en deux étapes

Afin d'optimiser la productivité en astaxanthine, une stratégie de culture en deux étapes est souvent adoptée, notamment pour *H.pluvialis* et *C.zofingiensis*. Cette approche permet d'améliorer la productivité en biomasse et en astaxanthine, ainsi que le rendement global du procédé (voir **Figure 11**).

La première étape, appelée étape verte, est une phase de croissance où les microalgues sont cultivées dans des conditions optimales avec un milieu riche en nutriments. Cela permet d'obtenir une croissance rapide et une accumulation de biomasse. Cependant, la culture en une seule étape présente des difficultés. Les conditions optimales pour la croissance des microalgues ne sont pas nécessairement les mêmes que celles qui favorisent la production d'astaxanthine. Dans une culture en une seule étape, la production de biomasse et la production d'astaxanthine se produisent simultanément. C'est une approche simple, mais elle peut être moins efficace pour l'accumulation d'astaxanthine. Il peut être difficile de créer un environnement qui favorise à la fois la croissance et le stress nécessaire pour la production d'astaxanthine. Par conséquent, la gestion des ressources peut être complexe et le rendement peut être affecté. C'est là qu'intervient une deuxième étape, appelée étape rouge. Cette méthode sépare donc la production de biomasse et la production de pigment dans le temps. Elle se déroule dans deux bioréacteurs l'un après l'autre. Bien que cette technique soit plus compliquée, elle peut permettre une accumulation d'astaxanthine beaucoup plus efficace. La biomasse produite est soumise à des conditions de stress pour inciter les cellules à produire davantage d'astaxanthine pour se protéger du stress appliqué (Liyanaarachchi et al., 2021). Néanmoins, les deux méthodes nécessitent des bioréacteurs fermés (au moins à l'étape verte).

L'adoption de la stratégie de culture en deux étapes a permis de surmonter ces difficultés. En particulier, cette stratégie a été retenue pour la production d'astaxanthine à grande échelle par *H. pluvialis* selon (Aflalo et al., 2007; B. Y. Zhang et al., 2009).

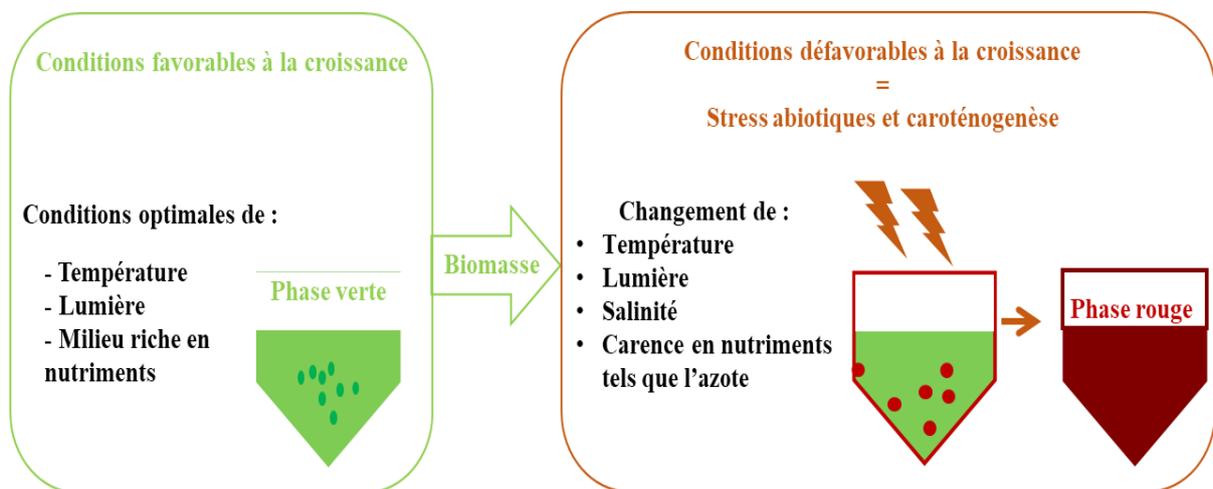


Figure 11 : Stratégie en deux étapes de culture adoptée pour la production d'astaxanthine.

Tableau 6 : Accumulation des caroténoïdes sous diverses conditions de stress.

Souche microalgale	Caroténoïde	Stratégie en deux phases		Concentration/ productivité	Références
		1 ^{ère} phase	2 ^{ème} phase		
<i>H.pluvialis</i> UTEX 2505	Astaxanthine	Culture en batch phototrophe à 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	Augmentation de l'intensité lumineuse à 300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, et de la teneur en CO_2 (15%)	36 mg/g d'astaxanthine	(Christian et al., 2018)
<i>H.pluvialis</i> NIES 144	Astaxanthine	Culture en batch phototrophe à 25 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ avec réalimentation en azote	Culture en fed-batch à 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, avec un milieu sans azote et un complément périodique d'éthanol	138,7 mg/L	(Wen et al., 2015)
<i>H.pluvialis</i> NIES 144	Astaxanthine	Culture en mixotrophie, à 120-150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	Culture en batch en mixotrophie, avec limitation en azote à 150-450 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.	602 mg/L et 15,8 mg/L/j	(Park et al., 2014)
<i>H.pluvialis</i> Flotow EGE MACC-35	Astaxanthine	Culture à 25 °C avec éclairage continu de 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	Culture à 546 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, dans l'eau distillée enrichie en CO_2 et dans le milieu Rudic dépourvu d'azote	29,62 et 30,07 mg/g	(Imamoglu et al., 2009)
<i>C.zofingiensis</i> ATCC 30412	Astaxanthine	Culture en hétérotrophie, avec glucose comme source de carbone	Après dilution, culture en fed-batch mixotrophe avec ajout périodique de glucose et épuisement de l'azote dans un PBR à 200-1500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	5,3 mg/L/d	(Zhang et al., 2017)
<i>D.baradawil</i> ATCC 30861	Bêta-carotène	Culture en extérieur en phototrophie en bassin ouvert	Dilution de culture et privation en azote	1 ^{ère} phase : 1-450 mg/m ² /j 2 ^{ème} phase : 2-300 mg/m ² /j	(Ben-Amotz, 1995)
<i>D.salina</i> CCAP 19/18	Bêta-carotène	Culture en phototrophie dans un PBR à panneau plat (200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)	Augmentation de l'intensité lumineuse à 1400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	37 mg/L/j	(Lamers et al., 2010)

5 Technologies de culture puis de traitement des microalgues

5.1 Systèmes de culture

La culture des microalgues peut être réalisée en utilisant deux types principaux de systèmes : les systèmes ouverts et les systèmes fermés (**Figure 12**). Chacun présente ses propres avantages et inconvénients, qui sont discutés ci-dessous.

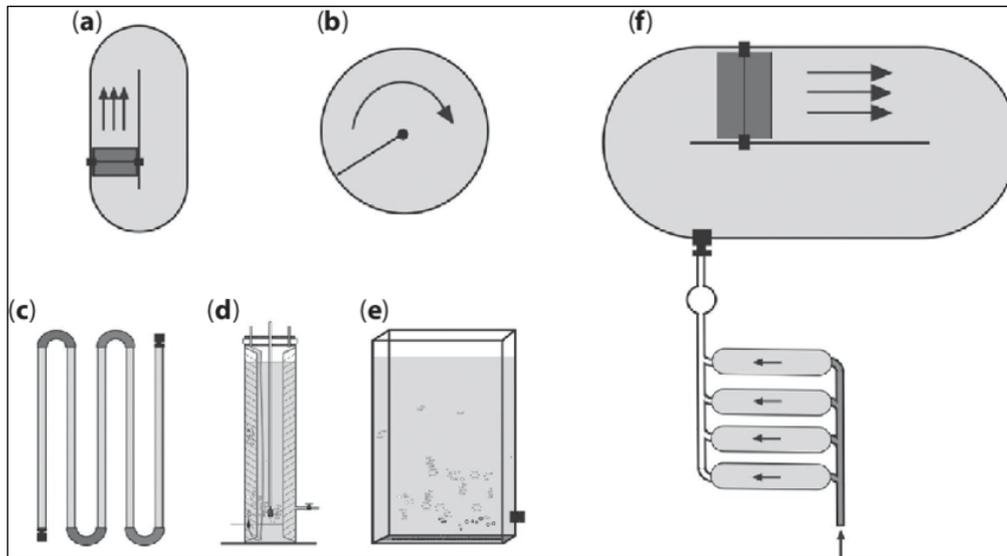


Figure 12 : Différents systèmes de culture des microalgues. (a) Bassin ouvert de type “raceway”, (b) bassin circulaire, (c) PBR tubulaire horizontal, (d) PBR airlift, (e) PBR panneau plat, (f) système hybride, bassin ouvert “raceway” avec des PBR tubulaires horizontaux (Sanz Smachetti et al., 2018).

À grande échelle, les réacteurs à bassin ouvert sont généralement privilégiés en raison de leur faible coût de construction, d’entretien et d’exploitation. Cependant, les photobioréacteurs fermés offrent plusieurs avantages, notamment une meilleure efficacité photosynthétique, une productivité de biomasse plus élevée, une concentration plus importante et une pureté accrue des molécules d’intérêt. Le choix du système de culture dépend principalement du coût d’installation et de fonctionnement du système, du taux de croissance relativement faible des microalgues (par rapport aux bactéries) et de leur besoin en énergie lumineuse. De plus, il est crucial de prendre en compte les caractéristiques spécifiques de la microalgue à cultiver (telles que la sensibilité aux variations locales ou temporelles de température, de pH, de composition chimique, et son comportement hydrodynamique comme sa vitesse de décantation par exemple) et les conditions optimales de croissance à contrôler (température, luminosité, nutriments, pH, niveau d’impuretés ou de contamination) en fonction de l’échelle de production souhaitée (Costa & de Morais, 2014).

5.1.1 Systèmes ouverts

Dans un système ouvert, comme les bassins naturels et artificiels, l’utilisation de la lumière solaire représente un avantage majeur. En effet, c’est une source d’énergie naturelle et gratuite que les microalgues peuvent exploiter.

Les parois de ces systèmes sont généralement faites en béton, en terres arables ou dégradées. Cependant, pour éviter d'utiliser des terres de grande valeur, ils peuvent également être construits en plastique, en verre ou en brique.

La configuration de ces systèmes peut varier considérablement en fonction de la taille, de la profondeur, du type de matériau utilisé, du système d'agitation et du degré d'inclinaison. Lors de la construction d'un bassin ouvert, il est essentiel de garantir un ensoleillement suffisant. D'autres critères importants à respecter incluent la force hydrodynamique et l'utilisation d'un canal en circuit fermé pour uniformiser la distribution des cellules.

Malgré leur coût relativement faible, leur facilité d'exploitation et leur durée de vie, l'utilisation de ces systèmes peut être limitée par plusieurs inconvénients majeurs. L'auto-ombrage limite la profondeur utile des bassins, rendant la croissance des microalgues principalement superficielle. Sans un brassage adéquat, des zones "mortes" peuvent apparaître, présentant un risque de contamination à l'ensemble du système. De plus, la contamination par l'air et l'eau peut rendre difficile le maintien des monocultures de microalgues, sauf pour les espèces extrémophiles. Les cultures de microalgues en extérieur dépendent également des paramètres météorologiques locaux, ce qui peut rendre la production saisonnière. En outre, la récolte peut être délicate et coûteuse en raison de la faible densité cellulaire généralement obtenue dans les systèmes ouverts. La production d'ingrédients d'intérêt commercial semble très limitée dans le cas des microalgues en raison des inconvénients mentionnés.

Néanmoins, des conditions extrêmes permettent la production à grande échelle de microalgues, que ce soit en mono ou en polyculture, dans des bioréacteurs à bassins ouverts. Seules les microalgues qui sont adaptées à ces conditions extrêmes, comme une salinité élevée (par exemple, *Dunaliella*), une forte concentration en nutriments (par exemple, *Chlorella*) et une alcalinité élevée (par exemple la cyanobactérie *Spirulina*), sont susceptibles d'être cultivées avec succès dans des réacteurs à bassin ouvert (Perez-Garcia et al., 2011; Zuccaro et al., 2020).

Il existe deux catégories de systèmes de culture ouverts : non-agités et agités.

5.1.2 Systèmes ouverts non-agités

Les lagunes, qu'elles soient naturelles (comme les lacs) ou artificielles, sont couramment utilisées à échelle industrielle pour une production en masse de microalgues. Ces lagunes peuvent être classées dans la catégorie des bassins ouverts non agités. La production dans des lacs ouverts est un procédé naturel, car elle est soumise aux conditions environnementales et dépend de la présence d'eau et des nutriments essentiels à la croissance cellulaire. La microalgue extrémophile halotolérante, *D.salina* est un exemple qui fait l'objet d'une exploitation commerciale importante, pour la production du bêta-carotène dans les bassins naturels (Tan et al., 2020).

5.1.3 Systèmes ouverts agités

Dans les systèmes de culture ouverts agités, on peut distinguer deux types : les bassins circulaires et les bassins de type "raceway".

Les bassins circulaires artificiels sont particulièrement employés dans les procédés de traitement des eaux. Ces réservoirs sont généralement construits avec une profondeur de 30 à 70 cm et un diamètre de 30 à 50 m. Pour assurer un mélange efficace de la culture, la taille de ces bassins doit être limitée à 10 hectares, l'homogénéisation étant réalisée au moyen d'un bras rotatif. L'augmentation du rendement total de la biomasse peut être obtenue en utilisant une roue à aubes pour maintenir les microalgues en suspension à une profondeur de 20 à 30 cm, et en ajoutant du CO₂ à l'eau pour stimuler la croissance cellulaire, compte tenu de la faible solubilité du CO₂ atmosphérique dans l'eau (Kurniawan et al., 2022).

Les bassins de type "raceway", sont généralement peu profonds et équipés de systèmes d'homogénéisation des algues et des nutriments, tels que les roues à aubes, les hélices, les systèmes de type air-lift ou les pompes. Bien que l'exploitation de ces bassins soit relativement peu coûteuse, leur rentabilité peut être limitée par un rendement faible. Cela peut être dû à un mélange insuffisant, à la contamination, à la présence des zones sombres ou à un apport inefficace de CO₂. L'évaporation peut également avoir un impact, car elle entraîne une consommation d'eau plus élevée. Plusieurs espèces de microalgues, telles que *Chlorella*., *Arthrospira*, *Haematococcus*, *Dunaliella* et *Nannochloropsis* ont été cultivées avec succès dans des bassins de types "raceways" (Dubinsky, 2013; Khan et al., 2022; Tebbani et al., 2014).

5.1.4 Systèmes fermés ou photobioréacteurs (PBR)

Au fil des années, la culture des microalgues en système fermé a connu de grandes avancées. Les photobioréacteurs (PBR), caractérisés par leur ratio élevé de surface sur volume, offrent une régulation et un contrôle précis des paramètres vitaux pour des microalgues, tels que la lumière, les nutriments, le CO₂, la température et le pH. Ces systèmes permettent d'ajuster l'intensité lumineuse pour maximiser la photosynthèse et de réaliser une culture axénique, favorisant ainsi une productivité de biomasse améliorée, particulièrement avec des souches sensibles aux contaminations (S.-K. Wang et al., 2014). Toutefois, les coûts d'investissement, opérationnels et de maintenance des PBR sont très élevés, rendant difficile la rentabilité des unités de production en continu de microalgues (Peter et al., 2022).

Les PBR peuvent être construits en verre ou en plastique, matériaux transparents qui permettent aux microalgues d'être exposées à la source lumineuse. L'agitation peut être réalisée au moyen d'une pompe ou via un système du bullage (air-lift). Les PBR se classent en deux configurations : tubulaire et à panneaux plats. Les PBR tubulaires, largement exploités dans le domaine de la recherche académique, peuvent être déposés horizontalement, verticalement, inclinés ou en hélice. D'autre part, les PBR à panneaux plats offrent le meilleur ratio de surface illuminées par la densité cellulaire obtenue, bien qu'ils occupent plus de surface que les PBR tubulaires pour un même volume. Ils peuvent être positionnés verticalement ou inclinés face au soleil. Les PBR peuvent être installés à l'intérieur, où ils sont exposés à l'éclairage artificiel, ou à l'extérieur, où ils bénéficient de la lumière naturelle. Avant de commencer toute culture en PBR, il est nécessaire de concevoir un système approprié qui implique de minimiser la consommation d'eau et d'énergie et de limiter la production des déchets (Suparmaniam et al., 2019).

5.1.5 Système de culture hybride en deux phases

La culture hybride en deux phases, qui est une combinaison d'un système fermé et d'un système ouvert, offre un équilibre optimal entre coûts, productivité, problèmes de contamination et consommation d'énergie. Cette approche tire parti des avantages de ces deux systèmes. Dans le cadre d'une mise en œuvre à grande échelle, il a été démontré que le système PBR fermé est économiquement viable pour produire un inoculum stable de manière continue. Une fois cet inoculum établi, la culture est ensuite transférée dans un bassin ouvert pour une phase de croissance en batch de courte durée. Cette méthode permet d'abord de favoriser la croissance cellulaire dans des conditions axéniques contrôlées, grâce au système PBR. Ensuite, en passant à un bassin ouvert, les cellules sont exposées à des conditions de stress, ce qui favorise la bioaccumulation des biomolécules recherchées (Chen et al., 2021; Narala et al., 2016).

5.2 Modes de culture

5.2.1 Mode autotrophe

En mode autotrophe, la lumière est la seule source d'énergie des microalgues par le biais de la photosynthèse, afin de croître et maintenir les fonctions cellulaires. Ce mode de culture est généralement réalisé dans des systèmes de culture fermés, tels que les photobioréacteurs, pour optimiser l'exposition à la lumière et minimiser la contamination (Ugwu et al., 2008).

5.2.2 Mode hétérotrophe

En culture hétérotrophe, les microalgues métabolisent certaines molécules organiques présentes dans leur milieu, indépendamment de la lumière, qu'elles utilisent comme source de carbone et d'énergie. Il existe des souches qui peuvent croître en hétérotrophie même en présence de la lumière, ce qu'on appelle alors la photohétérotrophie. Le glucose est la source de carbone la plus couramment utilisée. L'hétérotrophie a pour atout de surmonter la contrainte de la lumière, aboutissant à une croissance cellulaire rapide et à une production accrue de biomasse. Cependant, peu de souches sont capables de survivre avec ce mode en raison de l'activité microbienne potentielle qui peut avoir un effet négatif sur la culture (Ighalo et al., 2022).

5.2.3 Mode mixotrophe

Une culture mixotrophe est caractérisée par la capacité de certaines microalgues à assimiler à la fois du carbone organique et inorganique comme source de carbone. Cela implique que ces microorganismes peuvent croître en mode phototrophe, hétérotrophe, ou une combinaison des deux. Ce mode de culture est particulièrement efficace pour le traitement des eaux usées riches en carbone et pour la séquestration du CO₂ atmosphérique.

Des études ont montré que certaines espèces de microalgues présentent une productivité de biomasse plus élevée lorsqu'elles sont cultivées en mode mixotrophe (SundarRajan et al., 2019; Tan et al., 2020). Par exemple, *D.salina* a démontré une production de biomasse élevée de 1,16 g/L en mode mixotrophe, comparativement à 0,59 g/L en mode autotrophe et 0,90 g/L en mode hétérotrophe. De même, *H.phuvialis* a montré une augmentation de la production de biomasse, passant de 0,7 g/L en mode autotrophe à 1,12 g/L en mode mixotrophe (Abreu et al., 2022).

5.3 Exemples de production de microalgues à grande échelle

5.3.1 Production d'astaxanthine à partir d'*H. pluvialis*

La microalgue *H.pluvialis* est l'une des souches qui a été mise à l'échelle industrielle avec succès, permettant la production d'astaxanthine en grande quantité, à haute pureté et en deux étapes. La **Figure 13** montre un exemple de culture en photobioréacteurs installés par l'entreprise Algatech connue par sa production d'astaxanthine à grande échelle.

Selon le projet mené par Fei et al., (2022), la production d'astaxanthine a été optimisée pour atteindre une concentration de 15,6 mg/L en minimisant les contaminants biologiques. La phase verte a été réalisée en mode hétérotrophe et en batch dans un fermenteur de 50 litres, puis élargie à un fermenteur de 1000 litres, sans éclairage. La température était contrôlée à 25 °C et le pH maintenu entre 7,5 et 8 en utilisant l'acide acétique comme source de carbone organique. La culture a été arrêtée lorsque la matière sèche obtenue a atteint 10 g/L, tandis que les sources de carbone et d'azote étaient épuisées. La culture a alors été diluée puis transférée dans un PBR tubulaire de 16,5 m³ situé à l'extérieur afin d'initier la phase rouge, induite par la limitation en azote, comme facteur de stress, et le soleil comme source de lumière. La température a été maintenue en dessous de 30 °C avec de l'eau froide ruisselant sur le dessus des tubes. Enfin, le CO₂ a été injecté à la sortie d'une pompe centrifuge afin de réguler le pH de la culture.



Figure 13 : Photobioréacteurs tubulaires de la culture d'*H.pluvialis* pour la production d'astaxanthine à grande échelle par l'entreprise Algatech (www.algatech.com).

5.3.2 Production d'astaxanthine à partir de *C.zofingiensis*

Les recherches menées sur la souche de *C.zofingiensis* sont toujours en phase de développement à l'échelle pilote de laboratoire, en vue d'une production à grande échelle d'astaxanthine. La production d'astaxanthine à partir de la microalgue *C.zofingiensis* utilise également une stratégie en deux étapes.

Une étude intéressante a été menée par (Zhang et al., 2017) à une échelle de 5 L. La biomasse verte a été produite par fermentation en mode hétérotrophe en intérieur, puis transférée dans un photobioréacteur rotatif flottant à l'extérieur pour induire la synthèse d'astaxanthine. La première étape de fermentation a permis d'atteindre une haute densité cellulaire de 98,4 g/L.

Lors de la deuxième étape, le stress, a efficacement induit l'accumulation d'astaxanthine atteignant une concentration de 73,3 mg/L, avec une productivité de 5,26 mg/L/jour en absence d'azote, en présence du glucose (20 g/L) et avec une intensité lumineuse variant entre 200 et 1500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (lumière solaire).

5.3.3 Production de bêta-carotène à partir de *D.salina*

La microalgue halotolérante *D.salina* produit de grandes quantités de bêta-carotène. La **Figure 14** montre un exemple de culture à grande échelle en Australie en bassins ouverts.

Une étude menée au Maroc a démontré la faisabilité industrielle de la culture de *D.salina* pour la production de bêta-carotène sur la saline continentale de Tissa. Un système de production semi intensif a été mis en place, comprenant cinq bassins extérieurs totalisant 1800 litres de culture. Des cultures monospécifiques ont été obtenues dans des bassins extérieurs où la salinité atteint la saturation, favorisant ainsi la production du pigment recherché. La densité cellulaire obtenue était de $3,10 \times 10^6$ cellules/mL et la production de bêta-carotène était de 39,0 mg/L, soit 484 mg/m²/jour à 15% de salinité et 5 mM de nitrates (Mouradi et al., 2009).



Figure 14 : Culture en bassins ouverts, lagune artificielle de Hutt Lagoon en Australie de *D.salina* pour la production du bêta-carotène (Bodenes, 2017).

5.4 Méthodes de récolte

Dans le domaine de la production de microalgues, le procédé de récolte représente un défi majeur, engendrant généralement 20 à 30% du coût total. Le coût associé à cette étape peut fluctuer en fonction de plusieurs facteurs. Ceux-ci incluent la technologie de récolte utilisée, le type de microalgues cultivées, l'échelle de production et l'efficacité du processus de récolte. Un des défis technologiques majeurs rencontrés dans les procédés de production des microalgues est la faible concentration de biomasse algale dans le milieu de culture, qui entraîne une consommation énergétique conséquente. Il est donc essentiel de sélectionner une technologie de récolte adaptée pour optimiser le procédé et réduire les coûts. La sélection de la technologie la plus appropriée doit être effectuée de manière à ne pas interférer avec l'utilisation finale de la biomasse microalgale (Esteves et al., 2020; Min et al., 2022).

Les technologies de récolte couramment utilisées pour les microalgues comprennent la centrifugation, la filtration, la sédimentation et la floculation.

5.4.1 Centrifugation

La centrifugation est souvent reconnue comme une méthode rapide et efficace pour la récolte de biomasses microalgales de haute qualité, sans contamination chimique ou bactériologique. Mais, elle est également l'une des méthodes les plus énergivores et coûteuses. En effet, la centrifugation requiert généralement une énergie élevée et peut entraîner l'usure de l'équipement utilisé, ce qui se traduit par des coûts d'entretien élevés (Mata et al., 2010).

5.4.2 Filtration

La filtration est une autre technologie de récolte couramment utilisée. Bien qu'elle semble être moins énergivore et coûteuse que la centrifugation, elle peut nécessiter un remplacement fréquent des filtres qui peuvent se dégrader en raison de l'encrassement des membranes. Cela peut engendrer des coûts supplémentaires. Dans le cas des microalgues de petite taille, la filtration peut être un procédé long et énergivore (Ahmad et al., 2012).

5.4.3 Sédimentation

La sédimentation est une méthode qui consiste simplement à laisser les microalgues se déposer au fond d'un récipient ou un bioréacteur par gravité. Cette méthode est simple, peu coûteuse et particulièrement adaptée aux cultures à haute densité cellulaire. Cependant, elle peut être lente. Elle est particulièrement économique lorsqu'il s'agit de microalgues granulaires activées pour le traitement des eaux usées (Tiron et al., 2017).

5.4.4 Flocculation

La flocculation est une technologie de récolte qui nécessite l'ajout d'un agent flocculant, chimique ou biologiques, au milieu de culture de microalgues. Cela favorise l'agglutination ou l'agrégation des cellules en particules de grande taille, facilitant ainsi leur séparation du liquide. Cette technologie se distingue des autres technologies, comme la centrifugation et la filtration, par sa faible consommation d'énergie, permettant de réduire les coûts. Cependant, bien que cette méthode soit relativement peu coûteuse, elle est souvent moins efficace, engendrant des rendements de récolte de biomasse plus faible et des temps de traitement plus longs. En outre, la présence d'agents de flocculation peut entraîner des complications, telles que la contamination, nécessitant un post-traitement pour décontaminer le produit final. Malgré ces limitations, la flocculation peut être une technique utile pour les opérations à petite échelle (J. Kim et al., 2013).

5.5 Méthodes de séchage

La biomasse de microalgues subit généralement une étape de séchage après sa récolte. Cette étape est importante car la présence d'eau peut interférer avec l'extraction des molécules intracellulaires. De plus, le séchage a pour atout de prolonger la durée de conservation de la biomasse et prévient la contamination (Vítová, 2020).

Chaque technologie de séchage a ses propres avantages et inconvénients, rendant la sélection de la méthode de séchage essentielle et dépendant des résultats finaux souhaités. Les technologies de séchage couramment utilisées pour les microalgues sont présentées ci-dessous.

5.5.1 Séchage par atomisation

Le procédé de séchage par pulvérisation consiste en la dispersion d'une suspension de microalgues dans un flux d'air chaud, ce qui entraîne une évaporation rapide de l'eau. Bien que cette technologie soit reconnue pour sa rapidité et son efficacité, elle peut être coûteuse, énergivore, et peut potentiellement engendrer une dégradation de la biomasse en raison des températures élevées utilisées. Ce séchage est généralement considéré comme une méthode appropriée dans le cas des microalgues destinées à la consommation humaine, en raison de la digestibilité finale qu'elle permet. Cependant, une dégradation des cellules microalgales pourrait se produire (Show et al., 2015). Dans l'étude de Raposo et al., (2012), les résultats les plus prometteurs ont été obtenus avec une biomasse d'*H.pluvialis* séchée à 180/110 °C et stockée à -21 °C sous azote. Dans ces conditions, la dégradation de l'astaxanthine était inférieure à 10% après 9 semaines de stockage. Ces résultats soulignent l'importance de choisir des conditions de séchage et de stockage appropriées pour préserver la qualité de la biomasse d'algues et ses composants.

5.5.2 Lyophilisation

La technologie de séchage par lyophilisation est la méthode couramment utilisée pour sécher les biomasses de microalgues productrices de caroténoïdes. Elle implique la congélation de la biomasse microalgale, qu'elle soit récoltée ou en suspension, suivie d'une sublimation de l'eau sous vide. Ce procédé doux et efficace préserve l'intégrité et la qualité du produit, mais il peut s'avérer coûteux et énergivore, et peut être long (Vázquez-Romero et al., 2022).

5.5.3 Séchage au tambour

Dans cette technologie, la suspension de microalgues est déposée sur un tambour rotatif chauffé, induisant l'évaporation de l'eau. Ce procédé offre l'avantage de stériliser la biomasse, mais il pourrait également provoquer la rupture indésirable des parois cellulaires. Bien que cette technologie soit simple et efficace, elle peut causer des dégradations des cellules et de leurs molécules en raison des températures élevées utilisées (Show et al., 2015).

5.5.4 Séchage solaire

Le séchage par énergie solaire se fait directement par l'exposition de la biomasse microalgale à l'irradiation solaire. Bien que cette méthode soit naturelle et écologique, elle est néanmoins assez lente. De plus, l'efficacité de séchage est fortement influencée par les conditions météorologiques. Par exemple, lors des journées excessivement ensoleillées, la montée de la température peut entraîner une dégradation de la biomasse. De même, les journées pluvieuses ou nuageuses peuvent également affecter le procédé de séchage (Saravanan et al., 2023). Pour pallier ces risques, l'entreprise Française Algoa-spiruline a développé une technologie de séchage indirecte et peu énergivore pour la spiruline, réalisée dans une serre en verre. Grâce à l'utilisation de l'air chauffé de l'intérieur de la serre, l'air est extrait, filtré puis dirigé vers le séchoir. Cela permet de réduire l'humidité de 90% à 9% en seulement 8 heures par jour de grand ensoleillement. En cas de jours moins ensoleillés, un déshumidificateur d'appoint est ajouté pour assurer l'efficacité de la technologie du séchage.

5.6 Méthodes de rupture cellulaire

En raison de la robustesse structurelle des parois cellulaires des microalgues, une étape de rupture ou de perméabilisation des membranes cellulaires est indispensable pour en extraire les molécules intracellulaires. Plusieurs méthodes de prétraitement physique ont été développées ces dernières années, qui visent à rompre ou à perméabiliser les barrières cellulaires. Parmi celles-ci figurent le broyage à billes, l'homogénéisation à haute pression, l'ultrasonication, l'application des champs électriques, et l'utilisation de micro-ondes (Grimi et al., 2014). En outre, des méthodes de traitement chimique ou biologique sont également utilisées, qui consistent à employer des acides ou des enzymes pour provoquer une lyse cellulaire. Toutefois, le choix de la méthode appropriée à la rupture cellulaire dépend de l'espèce microalgale à traiter, en particulier, des variations de la rigidité de la paroi cellulaire, de l'état de biomasse (humide ou séchée) et de la molécule ciblée. Dans le contexte des microalgues productrices des caroténoïdes, diverses méthodes de traitement sont utilisées pour la microalgue *H.pluvialis*, qui peuvent également être appliquées à *C.zofingiensis* pour faciliter l'extraction d'astaxanthine (Dutta et al., 2023; Show et al., 2015). Cette partie se concentre sur le broyage à billes, l'application des champs électriques et l'ultrasonication.

5.6.1 Broyage à billes

Le broyage à billes est une méthode qui vise à réduire la taille des particules, en utilisant des billes. Elles peuvent être en verre, zirconium, acier ou céramique et sont placées dans un compartiment cylindrique au contact de la biomasse. L'agitation à grande vitesse de ces billes génère une force mécanique intense qui conduit à la rupture des parois cellulaires. L'efficacité du broyage dépend de plusieurs paramètres, tels que : la taille des billes et la robustesse des parois cellulaires (Lari et al., 2019; Mohan et al., 2014).

La méthode du broyage à billes est largement applicable à des espèces de microalgues vertes, particulièrement à *Chlorella* et *Nannochloropsis* (Alavijeh et al., 2020). De plus, elle est considérée comme la méthode la plus fiable pour faciliter l'extraction d'astaxanthine à partir de la microalgue *H.pluvialis* à l'échelle commerciale selon (Ritu et al., 2023). Même si ce type de traitement mécanique semble efficace, il est énergivore, produit de la chaleur, et conduit à la formation de petits débris cellulaires avec la dispersion du lysat dans les phases solide et liquide. Ces inconvénients constituent les principaux obstacles à l'utilisation de cette méthode, car ils augmentent les coûts de transformation en aval et compliquent la séparation du lysat dans le cadre d'un modèle de bioraffinerie (Dixon & Wilken, 2018; Shin et al., 2013).

5.6.2 Champs électriques pulsés

L'usage des champs électriques pulsés (CEP) a connu une large application ces dernières années. De nombreuses recherches ont démontré les effets positifs du traitement par CEP, d'une part, sur la production des biomolécules d'intérêt en induisant une stimulation électrique qui stresse les cellules à en produire sans les altérer et d'autre part, sur l'assistance à l'extraction sélective de biomolécules grâce à la perméabilisation cellulaire (Ahirwar et al., 2022; Bocker & Silva, 2022; Zhang et al., 2023).

L'électroporation est induite par l'application de champs électriques de haute intensité sous forme de pulsations très courtes, de l'ordre de micro ou de milli secondes. Lorsqu'un champ électrique externe est appliqué, une forte polarisation de la membrane est induite, ce qui entraîne une augmentation du potentiel transmembranaire. L'électroporation peut provoquer une décomposition de la membrane, soit irréversible, soit réversible. Suite à l'application d'un champ électrique, un réarrangement de la bicouche lipidique des membranes se produit, créant des pores temporaires ou permanents qui facilitent le transport de molécules à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule. Une taille importante des pores conduit à une réduction de l'épaisseur de la membrane cellulaire, et lorsqu'une valeur critique de tension est dépassée, la membrane est rompue (**Figure 15**). Dans le cas des cellules végétales, l'intervalle de tensions utilisées varie de 1 à 2 kV/cm ((Zhang et al., 2011).

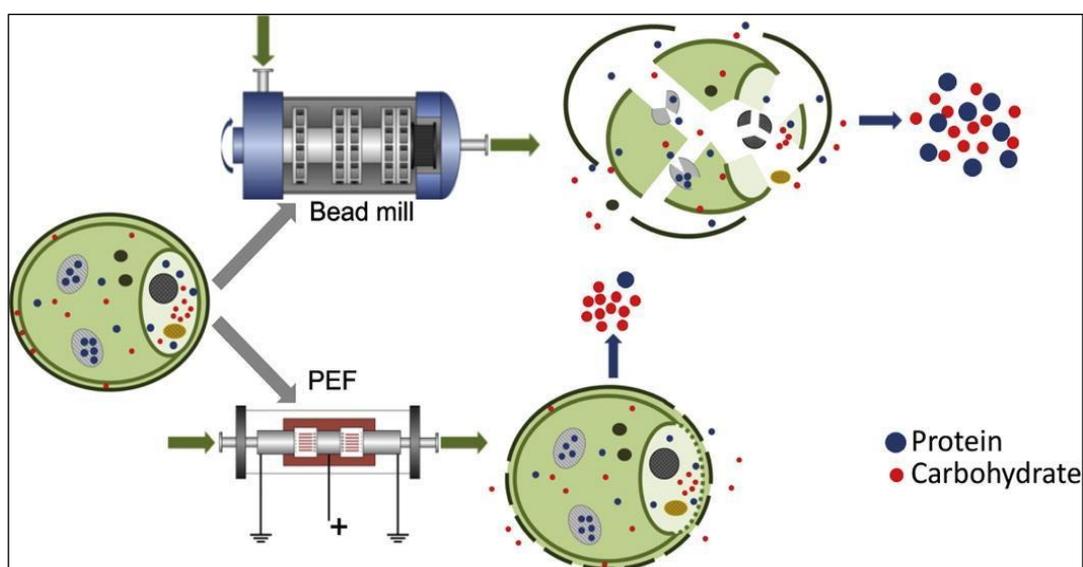


Figure 15 : Schéma illustrant l'effet de traitement par CEP et par broyage sur la paroi de *Chlorella vulgaris* (Postma et al., 2016).

La technologie des champs électriques pulsés est utilisée comme un prétraitement pour l'extraction sélective des composés hydrosolubles. L'étude menée par Goettel et al., (2013) sur la microalgue *Auxenochlorella protothecoides* a montré qu'après le traitement par CEP, les composés hydrosolubles étaient d'abord extraits, puis les lipides étaient récupérés via l'extraction au solvant. Ils ont constaté que l'application des CEP favorisait la libération spontanée des composés hydrosolubles. Néanmoins, le prétraitement des cellules a contribué à l'amélioration de l'extraction des lipides au solvant. Dans une autre étude distinctes menée par Grimi et al., 2014, ils ont démontré que l'application des champs électriques pulsés sur la microalgue *Nannochloropsis sp.* a facilité l'extraction des protéines, des composés ioniques solubles dans l'eau et de microéléments. Cependant, cette méthode de prétraitement s'est avérée inefficace pour l'extraction des pigments, molécules à faible hydrosolubilité.

Dans le but d'optimiser l'extraction des lipides et de l'astaxanthine accumulés par *Chlorella* et *H. phuvialis*, Kim et al., (2016) ont observé qu'il existe des obstacles communs entre ces souches, qui résident dans la composition, la structure et la rigidité de leurs barrières cellulaires.

Cette observation a été également corroborée par (Postma et al., 2016) lors de leur étude sur l'extraction sélective des composés intracellulaires à partir de *Chlorella vulgaris*. Ils ont trouvé que le traitement par CEP est efficace pour perméabiliser les cellules et libérer des molécules de petites tailles, comme les composés ioniques et les sucres simples. Néanmoins, la perméabilisation n'a pas réussi à libérer d'importantes quantités de protéines et de polysaccharides avec des rendements comparables à ceux obtenus par broyage à billes.

Pour surmonter l'obstacle de l'extraction d'astaxanthine à partir d'*H.pluvialis*, Martínez et al., (2019) ont exploré l'effet du prétraitement CEP. Ils ont déterminé que le traitement par CEP convient à l'extraction d'astaxanthine, sauf qu'il nécessite une période de macération après le prétraitement pour faciliter le transfert de masse. Dans cette étude, la biomasse rouge a été récoltée fraîche, traitée par CEP, puis macérée dans son milieu de traitement pendant 6 heures pour une extraction ultérieure d'astaxanthine avec divers solvants. Ils ont réussi à extraire 96% d'astaxanthine dans l'éthanol, soit 18,3 mg/g MS. Selon les résultats obtenus, le traitement par CEP suivi d'une macération pendant 6 heures s'est avéré aussi efficace que le broyage mécanique. Cette efficacité est attribuée à l'activité enzymatique qui se produit pendant l'incubation, où une enzyme estérase est libérée, permettant la digestion des parois perméabilisée par traitement CEP. Cependant, ces études mettent en évidence que la demande énergétique constitue la première contrainte à surmonter, en plus de la contrainte temps.

5.6.3 Ultrasonication

L'ultrasonication, qui consiste en l'application d'ondes sonores à basse fréquence (15-24 kHz) sur une biomasse de microalgues, est utilisée pour faciliter l'extraction de biomolécules. Cette technologie génère des cycles rapides de compression et de décompression des ondes sonores. La propagation de ces ondes à travers le milieu provoque la formation de microbulles. Ces dernières, qui contiennent de la vapeur d'eau, sont formées par le mouvement des molécules de liquide sous l'effet des ondes acoustiques. Ces microbulles augmentent ensuite en taille jusqu'à ce qu'elles deviennent instables et éclatent, un phénomène connu sous le nom de cavitation acoustique. Par conséquent, les cellules éclatent et la diffusion du contenu intracellulaire dans le milieu se produit, comme l'illustre la **Figure 16**. La cavitation acoustique se caractérise par une augmentation de la température et la formation de radicaux hydroxyles, qui endommagent également les cellules (Passos et al., 2014; Sivaramakrishnan & Incharoensakdi, 2018).

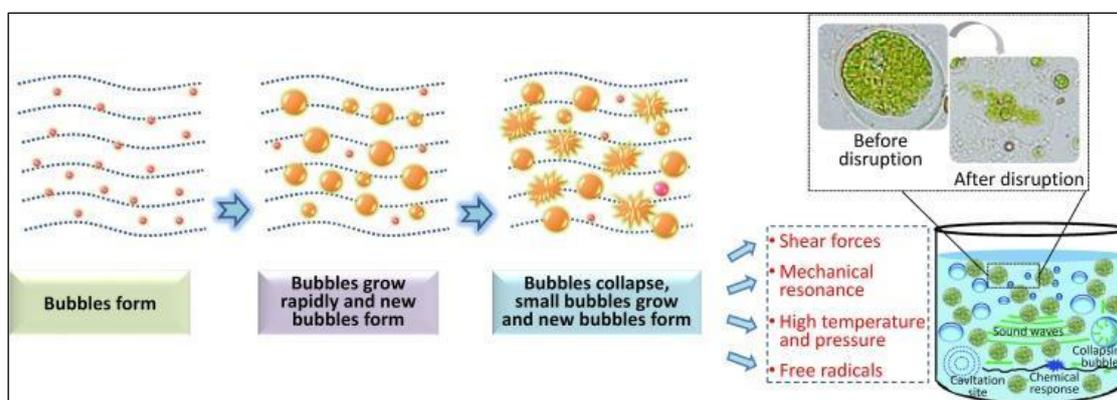


Figure 16 : Effet schématique des ultrasons sur les parois de microalgue (Y. Liu et al., 2022).

De nombreuses études ont mis en évidence l'efficacité des ultrasons pour améliorer l'extraction des biomolécules à partir de diverses microalgues. Par exemple, l'étude de R. Zhang et al., 2020 a confirmé les ultrasons pouvaient améliorer le rendement d'extraction des protéines à partir de deux espèces de microalgues, *Nannochloropsis sp.* et *P. kessleri*. Ils ont obtenu un rendement en protéines de 18-40% (m/m) en utilisant une puissance de 200 W pendant 11 minutes de traitement dans l'eau. De plus, Zou et al., 2013 ont démontré que l'extraction d'astaxanthine assistée par ultrasons à partir d'*H.pluvialis* était efficace. Ils ont réussi à atteindre une teneur de 27,58 mg/g pendant une durée de 16 minutes de traitement dans 48% éthanol dans l'éthyle acétate (v/v), à une puissance de 200 W. Enfin, une étude menée sur microalgue de *Spirulina platensis*, par Hadiyanto & Sutrisnorhadi, 2016, a révélé que le traitement par ultrasons améliorait significativement le rendement d'extraction des phycocyanines. Le traitement, qui a duré 42 minutes à une puissance de 200 W, a abouti à un rendement maximal de 15,7% (m/m).

Un des avantages majeurs des traitements par ultrasons réside dans leur potentiel de mise à échelle industrielle pour faciliter l'extraction des molécules de microalgues. Toutefois, cette technologie présente des limites, notamment son efficacité variable selon les espèces de microalgues. De plus, elle est souvent combinée à des traitements chimiques pour améliorer le rendement et réduire la durée et la consommation d'énergie (Corrêa et al., 2021). Il est également important de noter que les conditions de traitement peuvent engendrer des problèmes d'uniformité de la puissance appliquée par rapport à la consigne (Ojha et al., 2020).

D'autre part, le traitement par ultrasons peut provoquer la production de radicaux libres et la dégradation de pigments en raison des températures élevées et de l'exposition à l'oxygène, comme l'ont observé Zhao et al., (2006). Par conséquent, il est important de contrôler la température et la durée de traitement pour prévenir la détérioration des pigments thermosensibles (Cheng & Shah, 2021).

5.7 Extraction au solvant

Dans le cadre de l'extraction des caroténoïdes à partir de microalgues, les solvants sont couramment utilisés. Cette méthode conventionnelle fait généralement appel à des solvants organiques toxiques polaires ou apolaires. Toutefois, dans une perspective de rendre les procédés d'extraction plus respectueux de l'environnement, l'utilisation de solvants moins toxiques et biosourcés devient une nécessité, compte tenu de l'usage final des produits extraits (Mussagy et al., 2022).

Parmi les solvants utilisés pour l'extraction des caroténoïdes, on trouve l'éthanol, l'acétone, le diméthylesulfoxyde, l'acétate d'éthyle, l'hexane, le chloroforme et le méthanol. Ces solvants présentent des niveaux d'efficacité variables. À titre d'illustration, le diméthylesulfoxyde, lorsqu'il est utilisé seul, est reconnu comme un excellent solvant à la fois pour la perméabilisation des cellules et l'extraction. Cependant, pour améliorer la récupération simultanée des caroténoïdes polaires et non polaires, une combinaison de solvant sous forme de ratio volumique est souvent utilisée. Les solvants acétone et éthanol sont recommandés dans les procédés d'extraction des caroténoïdes à partir des matrices végétales contenant un taux élevé en humidité (Saini & Keum, 2018).

L'extraction au solvant peut présenter trois défis : 1) un temps d'extraction long, 2) la nécessité d'utilisation de grands volumes de solvants qui peuvent être toxiques, 3) des difficultés à passer à l'échelle industrielle. Pour pallier ces limitations, l'adoption de technologies innovantes, telles que le broyage, les champs électriques pulsés, les ultrasons, l'homogénéisation à haute pression ou les micro-ondes, peut s'avérer utile. En effet, l'application d'un prétraitement perturbe les barrières cellulaires, améliorant ainsi la mobilité des caroténoïdes dans le solvant et augmentant l'efficacité de l'extraction (Kim et al., 2022; Molino et al., 2018).

5.8 Méthodes de séparation et de purification

À la suite de l'étape extraction, l'obtention de bio composés à haute pureté est d'une grande importance. De ce fait, la pureté d'une biomolécule extraite détermine son utilité dans divers secteurs, allant de l'industrie alimentaire à la pharmaceutique (Spolaore et al., 2006). En conséquence, de nombreuses méthodes de purification ont été développées, en particulier chromatographiques, ces dernières années pour combler ce besoin, notamment pour purifier des caroténoïdes extraits à partir des microalgues.

5.8.1 Chromatographie semi-préparative

La chromatographie semi-préparative est une technique utilisée pour séparer et purifier des bio composés à une échelle plus grande que celle de la chromatographie analytique. Cette méthode est souvent utilisée pour séparer des composés en quantités intermédiaires, permettant une purification efficace tout en préservant la qualité de molécules ciblées. Des colonnes sont utilisées pour séparer les composés en fonction de leurs propriétés physico-chimiques, ce qui permet d'obtenir des fractions purifiées.

L'étude conduite par Yuan & Chen, (1998) est intéressante, car elle a permis de séparer et de purifier l'astaxanthine trans à partir d'extraits d'*H.pluvialis* par chromatographie semi-préparative. Une méthode HPLC en phase inverse était initialement développée pour la séparation des esters et des isomères d'astaxanthine à partir des extraits de pigments non saponifiés et saponifiés. Puis, une méthode de purification chromatographique a été mise en œuvre pour la préparation de l'astaxanthine trans naturelle à partir de l'extrait de pigments saponifiés. Les résultats obtenus ont montré que l'astaxanthine purifiée contenait environ 97,7% d'astaxanthine trans, 1,1% d'astaxanthine cis et 1,2% d'impureté. La méthode développée a permis d'isoler 3,7 mg d'astaxanthine à partir de 1 g de biomasse sèche d'*H.pluvialis*. Cela a mis en exergue l'efficacité de la chromatographie semi-préparative pour augmenter le rendement d'astaxanthine purifiée, d'où l'importance révélée de cette méthode.

5.8.2 Chromatographie liquide-liquide sur colonne

La chromatographie liquide-liquide sur colonne est une sous-catégorie de la chromatographie liquide. C'est une technique qui permet de séparer les composés d'un mélange en utilisant deux phases liquides immiscibles. Cette méthode repose sur la distribution différentielle des analytes entre les deux phases liquides, ce qui entraîne une séparation efficace des composants du mélange (Hamilton & Sewell, 1982).

Dans l'étude établie par Bauer & Minceva, (2019), la chromatographie liquide-liquide a été utilisée pour extraire directement de l'astaxanthine à partir des zoospores d'*H.pluvialis*. La méthode d'extraction a été initiée par la germination des kystes pour libérer des zoospores dans le milieu de fermentation. L'astaxanthine a ensuite été extraite directement, éliminant ainsi la nécessité de casser les parois cellulaires, de sécher ou d'utiliser du CO₂ supercritique. Une colonne chromatographique de 12,5 L a été préparée avec une phase stationnaire riche éthyle d'acétate et une phase mobile constituée d'un milieu de culture saturé avec le méthyl tert-butyl éther (MTBE). Une fois l'équilibre hydrodynamique atteint, la biomasse contenant les zoospores a été injectée dans la colonne. La phase mobile a ensuite été pompée à travers la colonne, permettant la dispersion de la biomasse et l'extraction de l'astaxanthine dans la phase stationnaire. Grâce à cette méthode, les auteurs ont réussi à obtenir une concentration élevée d'astaxanthine, de 500 mg/L, directement à partir du milieu de fermentation. Cette étude met en lumière le potentiel de la chromatographie liquide-liquide pour l'extraction de l'astaxanthine.

6 Conclusion

Au cours des dernières décennies, l'intérêt pour les microalgues a considérablement augmenté. Ces organismes constituent une source prometteuse de molécules biosourcées, allant de produits à haute valeur ajoutée, tels que les caroténoïdes, jusqu'aux précurseurs de biocarburants. Pour répondre à la demande dans ces applications, une production de biomasse importante et donc une productivité élevée sont nécessaires. Toutefois, pour être viable, le défi relevé exige que les systèmes de culture de microalgues soient non seulement performants en termes de productivité biologique, mais aussi du point de vue économique, énergétique et environnemental.

L'astaxanthine, pigment de la famille des caroténoïdes, est l'une des biomolécules d'intérêt qui peuvent être produites à partir de microalgues. Elle offre un large éventail d'applications dans le secteur alimentaire, nutraceutique et cosmétique.

La plupart des recherches et des projets industriels visant à optimiser de la production d'astaxanthine, se concentrent sur la microalgue *Haematococcus pluvialis*, connue pour sa richesse en astaxanthine et la fragilité relative de ses barrières membranaire. Toutefois, cette espèce ne se développe qu'à des températures optimales de 25-28 °C (espèce mésophile), ce qui limite sa culture en extérieur inadaptée au climat des pays froids ou tempérés et peu ensoleillés. D'un point de vue industriel, la production de biomasse algale en extérieur et à basse température pourrait contribuer à une réduction des coûts énergétiques.

D'autres microalgues, naturellement adaptées aux climats froids, peuvent également accumuler des caroténoïdes. Ces espèces, qui habitent dans les régions polaires et alpines, sont responsables du phénomène « sang des neiges » et peuvent survivre à des températures allant jusqu'à 0 °C. Le caroténoïdes astaxanthine produit par ces espèces joue un rôle de photoprotection lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables (forte irradiation solaire, faible température, faibles apports en nutriments et forte salinité). Cependant, peu d'études ont été menées sur ce type de microalgues extrémophiles.

Dans ce contexte, nous avons sélectionné deux souches dites « psychrophiles », , *Sphaerocystis sp.* et *Pleurastrum sp.* Ces microalgues ont pour atout de se développer à basse température (entre 2° et 18 °C) et à faible intensité lumineuse, et de synthétiser l'astaxanthine ainsi que d'autres caroténoïdes. D'une part, les travaux de cette thèse visent à optimiser la chaîne de procédés nécessaires à la production de caroténoïdes, en particulier d'astaxanthine, à partir des souches psychrophiles. Cela comprend la culture avec maîtrise des phases verte et rouge, la récolte, le prétraitement et l'extraction. D'autre part, l'objectif est d'étudier une combinaison de procédés sobres et économiques, certains innovants, permettant d'atteindre un taux de récupération satisfaisant des pigments recherchés.

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

1 Souches sélectionnées

Dans le cadre de ce travail, deux souches de microalgues psychrophiles ont été sélectionnées, *Pleurastrum sp.* (CCCRyo 006-99) et *Sphaerocystis sp.* (CCCRyo 100-99), pour leur capacité de production des caroténoïdes d'intérêt, tels que l'astaxanthine et la canthaxanthine, à basse température. Ces souches ont été fournies par la banque Culture Collection of Cryophilic Algae CCCryo, hébergée par le département de bioanalyse et de bioprocédés (IZI-BB) de l'Institut Fraunhofer de thérapie cellulaire et d'immunologie en Allemagne. Les souches sélectionnées sont des microalgues vertes qui appartiennent à la classe des chlorophycées, leur classification est détaillée dans le

Tableau 7.

Tableau 7 : Classification des microalgues psychrophiles établie dans la base de données NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Schoch et al., 2020).

Niveau	<i>Pleurastrum sp.</i>	<i>Sphaerocystis sp.</i>
Règne	<i>Eukaryota, Viridiplantae</i>	
Phylum	<i>Chlorophyta</i>	
Classe	<i>Chloropheaceae</i>	
Ordre	<i>Chlamydomonadales</i>	
Famille	<i>Pleurastraceae</i>	<i>Sphaerocystidaceae</i>
Genre	<i>Pleurastrum</i>	<i>Sphaerocystis</i>
Espèce	<i>Pleurastrum non classifiée</i>	<i>Sphaerocystis non classifiée</i>

Parmi de nombreuses microalgues de neige, les souches sélectionnées figurent dans une étude menée par (Leya et al., 2009). Ces chercheurs ont apporté des informations précieuses sur la culture en deux phases (verte et rouge) et la composition pigmentaire de plusieurs souches. Initialement isolées dans la région de Spitzberg, Svalbard, en Norvège (voir **Figure 17**), ces microalgues ont été transportées au laboratoire pour être cultivées. L'étude a, non seulement, confirmé la possibilité de leur culture en laboratoire, mais a aussi révélé la diversité des pigments qu'elles peuvent produire dans des conditions expérimentales spécifiques.

Avant l'envoi des souches, celles-ci ont été conservées à la banque sur un milieu solide d'agar, enrichi en vitamines pour prévenir leur mort pendant le stockage à long terme. Par la suite, le fournisseur a procédé à l'inoculation des microalgues sur un milieu liquide frais BBM. Après une attente d'environ un mois, nécessaire pour que les inocula atteignent une densité cellulaire suffisante, ils ont été ensemencés sur un milieu solide de BBM avec de la gélose (1,0-1,3 % d'agar) dans un tube en verre.

Les microalgues ont ensuite été livrées dans un emballage assurant le maintien du froid tout au long du transport express. Dès la réception, les tubes ont été placés dans l'incubateur à 10 °C à l'abri de la lumière. Étant donné qu'ils étaient complètement fermés pour le transport, ils ont été légèrement ouverts. Cette précaution, donnée par le fournisseur, était nécessaire car les cellules pouvaient avoir consommé tout le CO₂ présent dans le tube de culture, et l'oxygène produit pouvait inhiber la photosynthèse.



Figure 17 : Images satellites indiquant les lieux où les souches psychrophiles ont été isolées (Spitzberg, Svalbard, Norvège). La souche *Pleurastrum sp.* a été trouvée dans la région de Ny-Ålesund, illustrée à gauche, tandis que la souche *Sphaerocystis sp.* a été localisée dans la zone maritime de Kongsfjorden, représentée à droite.

1.1 *Pleurastrum sp.*

La microalgue *Pleurastrum sp.* a été isolée à partir du pergélisol (permafrost en anglais) et de la végétation moussue situés sous une falaise d'oiseaux avec une étendue neigeuse non persistante. Cette isolation a été réalisée par Hau U. Ling en 1999 dans la zone Est de Zeppelinhamna, près de Ny-Ålesund, Spitzberg, Svalbard en Norvège. Initialement nommée *Chlorococcum sp.* dans l'étude de (Leya et al., 2009), elle a ensuite été renommée *Macrochloris rubrioleum* dans l'étude de (Y. Kawasaki et al., 2015), avant d'être reclassée comme *Pleurastrum sp.* puis comme *Pleurastrum rubrioleum* en 2023 sur le site internet de la banque. Cette microalgue est capable de croître dans une plage de température allant de 2 °C à 18 °C, avec une température optimale de croissance de 8 °C. Elle se distingue par sa capacité à produire des caroténoïdes secondaires dans des conditions environnementales défavorables à la croissance, ainsi que par sa résistance face à la dessiccation.

1.2 *Sphaerocystis sp.*

La microalgue *Sphaerocystis sp.* a été isolée par Thomas Leya en 1999 à partir d'un échantillon de champs de mousses le long d'une rivière de fonte des neiges, en profondeur, sur les surfaces maritimes sous les étendues enneigées entre Hjellen (180 m) et Flåtjørna (195 m), Kongsfjorden, Ny Ålesund, Spitzberg, Svalbard, en Norvège. Initialement, cette microalgue était nommée *Chlamydocapsa spp.* dans l'étude de (Leya et al., 2009), avant d'être reclassée comme *Sphaerocystis sp.* sur le site internet de la banque. Elle est capable de produire des caroténoïdes secondaires dans des conditions environnementales défavorables à la croissance. Cette souche est capable de croître à des températures pouvant aller jusqu'à 18 °C, avec une température optimale de croissance de 14 °C.

1.3 *Haematococcus pluvialis*

La microalgue *H.pluvialis* a servi de référence pour l'étude de l'efficacité des méthodes d'extraction des caroténoïdes et de prétraitement appliqués sur les deux microalgues psychrophiles. Sa biomasse rouge a été achetée congelée auprès de la compagnie Astaxa Salata KVT Legumino, située à Salzbrucke en Allemagne, et conditionnée dans un seau de 8 kg à 24 % de matière sèche. Le seau a été expédié dans une boîte de carboglace et a été stocké dans un congélateur dès son arrivée. Les conditions de culture, de stress et de récolte des microalgues ont été fournies par l'industriel : la culture de la microalgue en phase verte a été réalisée dans le milieu liquide BG-11, avec une productivité variant entre 0,06 et 0,14 g/L/jour. Pour induire l'accumulation d'astaxanthine et des autres caroténoïdes secondaires durant la phase rouge, un stress a été appliqué en exposant la microalgue à deux carences nutritionnelles, en nitrate et en phosphate, à une température de 30 °C et sous une lumière bleue pendant vingt-quatre heures. La biomasse rouge a ensuite été récoltée par centrifugation.

2 Milieux de culture

Les différents milieux de culture utilisés (BBM, B3N, BNH4) sont détaillés dans le **Tableau 8** et le **Tableau 9**, y compris leur composition et préparation à partir des solutions stock.

Le BBM possède du nitrate (NO_3^-) comme source d'azote. Le B3N est un milieu similaire au BBM, mais avec une concentration en nitrate trois fois supérieure. Le BNH4 est similaire au B3N, mais le nitrate est remplacé par de l'ammonium (NH_4^+) tout en conservant les mêmes concentrations d'azote. Enfin, le TAP est le seul milieu qui comprend une source de carbone organique, l'acide acétique et comporte de l'ammonium comme source d'azote. Sa composition et préparation sont détaillées dans le **Tableau 10**.

En outre, un mix de trois vitamines, cyanocobalamine 0,5 g/L, biotine 0,1 g/L et thiamine-HCl 100 mg/L, est ajouté aux milieux de culture pour favoriser la croissance cellulaire. Selon le fournisseur, toutes les souches psychrophiles à la banque sont conservées avec un apport de vitamines pour prévenir leur mort pendant le stockage à long terme.

Tableau 8 : Composition des solutions stocks utilisées pour la formulation des milieux dérivés du BBM (B3N et BNH4).

Solution macroéléments (A)	Solution phosphore (P)	Solution azote (N)	Solution sel (S)	Solution bicarbonate (B)	NH ₄ Cl	Solution microéléments (μ-E)
MgSO ₄ ·7H ₂ O 7,5 g/L NaCl 2,5 g/L CaCl ₂ 2,5 g/L FeEDTA 2 g/L	K ₂ HPO ₄ 7,5 g/L KH ₂ PO ₄ 17,5 g/L	NaNO ₃ 25 g/L	NaCl 60 g/L	NaHCO ₃ 28 g/L	468 mg	ZnSO ₄ 8,82 g/L MnCl ₂ 1,44 g/L MoO ₃ 0,71 g/L CuSO ₄ 1,57 g/L Co(NO ₃) ₂ 0,49 g/L

Tableau 9 : Composition des milieux de cultures : BBM, B3N et BNH4, en mL de solutions stock pour 1 L de milieu.

Milieux	A (mL)	N (mL)	P (mL)	S (mL)	B (mL)	NH ₄ Cl* (mg)	μ-E (mL)	Eau-mQ (mL)
BBM	10	10	10	0	0	0	1	969
B3N	10	30	10	0	0	0	1	949
BNH4	10	0	10	0	0	468	1	979

NH₄Cl* : directement ajoutée dans le milieu sous forme de poudre.

Tableau 10 : Composition de 1 L de milieu de culture TAP.

Base Tris (g)	Sels TAP* (mL)	Solution PO ₄ ** (mL)	Éléments trace Hutner*** (mL)	Acétate concentré (mL)	Eau-milliQ (mL)
2,42	25	1	1	1	972

Sels TAP* : NH₄Cl 15 g/L, MgSO₄,7H₂O 4 g/L, CaCl₂ 2 g/L. Solution PO₄** : K₂HPO₄ 288 g/L, KH₂PO₄ 144 g/L. Éléments trace Hutner*** : Na₂EDTA, 2H₂O 50 g/L, ZnSO₄,7H₂O 22 g/L, H₃BO₃ 11,4 g/L, MnCl₂,4H₂O 5 g/L, FeSO₄, 7H₂O 5g/L, CoCl₂,6H₂O 1,6 g/L, CuSO₄, 5H₂O 1,6 g/L, (NH₄)₆MoO₃ 1,1 g/L.

3 Méthodes de suivi des cultures microalgales

Les différentes méthodes utilisées pour le suivi des cultures microalgales sont expliquées en détail. Ces méthodes ont permis de mesurer des paramètres vitaux tels que le taux de croissance cellulaire et la production de biomasse dans diverses conditions opératoires.

3.1 Mesure de la densité optique

Le suivi de la croissance des microalgues s'effectue grâce à l'utilisation d'un spectrophotomètre (UV-1800 Shimadzu™). La densité optique (DO) est mesurée à 800 nm où les pigments cellulaires n'absorbent pas, ce qui évite toute influence sur les résultats. Cette mesure permet de déterminer le taux de croissance cellulaire (μ), exprimé en jour⁻¹ (j⁻¹), un paramètre calculé pendant la phase de croissance exponentielle, en utilisant la formule suivante :

$$\text{Taux de croissance} = \frac{\ln(DO \text{ finale}) - \ln(DO \text{ initiale})}{\text{Temps}} \quad (\text{Eq. 1})$$

Avec:

DO finale : valeur de densité optique à la fin de la phase exponentielle à 800 nm

DO initiale : valeur de densité optique au début de la phase exponentielle à 800 nm

Temps : durée de la phase exponentielle exprimé en jour (j)

3.2 *Mesure de la matière sèche*

Pour compléter les résultats obtenus au spectrophotomètre, des matières sèches (MS) sont réalisées pendant la culture (une à deux fois par semaine). Ainsi, un volume précis de culture est centrifugé dans des tubes à 16504 g pendant 10 min à 4°C à l'aide d'une centrifugeuse de paillasse (5804 R Eppendorf™). Après la centrifugation, le surnageant est jeté, et le culot est lavé avec de l'eau milli-Q pour être centrifugé à nouveau avec les mêmes paramètres. Des coupelles sont préalablement séchées à l'étuve à 105°C pendant 10 minutes puis elles sont pesées à vide. Les culots lavés obtenus sont ensuite placés dans les coupelles pour sécher pendant au moins 24 heures dans l'étuve à 105°C. Enfin, la coupelle contenant la biomasse sèche est pesée. La matière sèche (exprimée en g/L) est alors estimée avec la formule suivante :

$$\text{Matière Sèche (g/L)} = \frac{(m_2 - m_1)}{V} \quad (\text{Eq. 2})$$

Avec :

m₂ : la masse de la coupelle pleine après le séchage, exprimée en (g)

m₁ : la masse de coupelle vide avant le séchage, exprimée en (g)

V : le volume de culture prélevé, exprimé en L.

Remarque : Cette méthode est aussi utilisée pour estimer la teneur en matière sèche de la biomasse destinée à l'extraction, avec une légère modification des volumes prélevés pour la mesure. De plus, une autre méthode rapide est mise en œuvre pour mesurer la matière sèche d'une biomasse humide à l'aide d'un dessiccateur à infrarouge (MA37- Sartorius). Cet appareil est une thermobalance équipée d'une lampe de chauffage infrarouge, qui permet de mesurer la matière sèche par thermogravimétrie à 105 °C. Le protocole consiste à placer une coupelle en aluminium vide dans l'appareil, qui est tarée. Par la suite, un échantillon de 0,5 g est déposé sur la coupelle pour un séchage d'environ 10 minutes (jusqu'à atteindre une valeur constante).

La productivité en matière sèche, P (g/L/j) a été estimée en utilisant l'équation suivant :

$$P = \mu \times MS \quad (\text{Eq. 3})$$

Avec : μ , le taux de croissance (jour⁻¹), et (MS) est la matière sèche (g/L) (Clément-Larosière, 2012).

3.3 *Mesure de la concentration en nutriments*

Une chromatographie ionique (Dionex™, ICS-5000⁺ Thermo Scientific) est utilisée pour déterminer la concentration des nutriments, sous forme ionique, dans les milieux de culture. L'appareil est équipé de deux colonnes : une pour les anions (Cl⁻, NO₃⁻, SO₄²⁻ et PO₄³⁻) (Dionex IonPac™ AS11-HC-4 μ m, 2x250mm) et une pour les cations (Na⁺, NH₄⁺, K⁺) (Dionex IonPac™ CS16, 3*250mm)). La température est fixée à 35 °C, avec un débit de 0,3 mL/min pour les anions et 0,36 mL/min pour les cations.

Les surnageants issus des points de prélèvement de culture sont filtrés à 0,2 μ m, dilués avec de l'eau ultrapure (dilution massique) pour entrer dans la gamme de mesure, et conservés à 4 °C

avant leur analyse. Les paramètres de la méthode et le traitement des données d'analyses sont gérés par le logiciel Chromeleon 7™. Les concentrations sont exprimées en mg/L.

3.4 Mesure du pH

La mesure du pH d'un volume de culture prélevé, s'effectue à l'aide du pH-mètre (FiveEasyPlus™ FP20-Basic, METTLER TOLEDO). Pour ce faire, la sonde de l'appareil est immergée dans le tube renfermant le surnageant du milieu de culture, obtenu suite à la centrifugation.

3.5 Observations morphologiques

L'observation morphologique des cellules est effectuée à l'aide d'un microscope optique, spécifiquement le modèle Axioplan 2 Imaging Zeiss. Pour procéder à l'observation, une goutte d'un prélèvement de culture homogène est déposée sur une lame de microscope, si nécessaire l'échantillon peut être dilué avec de l'eau. La goutte recouverte par une lamelle est ensuite observée au grossissement X400, ou X1000 avec ajout d'une goutte d'huile à immersion. Une caméra est connectée au logiciel AxioVision 4.8.2.0 permettant ainsi l'enregistrement de photographies des lames.

3.6 Lyophilisation des biomasses

Au départ, chaque culture de microalgues est centrifugée à 10 000 rpm pendant 10 minutes et à 4 °C. Le culot obtenu est séparé de son surnageant puis lavé avec de l'eau ultrapure avant d'être de nouveau centrifugé et séparé. Le culot lavé est par la suite congelé à -20 °C dans un tube recouvert de papier aluminium, et ce, pour au moins 24h avant de passer dans le lyophilisateur (CHRIST Alpha 1-2 LD PLUS de Grosseron).

Le protocole de lyophilisation comporte deux étapes : une première étape de dessiccation primaire à 1 mbar de pression pendant 24h, suivie d'une dessiccation secondaire à 0,07 mbar durant 24h à 48h, selon la quantité à lyophiliser. Une fois lyophilisés, les culots sont remis par précaution en stockage à -20 °C en prévision de traitements ultérieurs.

4 Méthodes d'extraction des pigments

Dans le processus d'extraction des biomasses microalgales, deux voies sont utilisées : la voie sèche et la voie humide. Pour la voie sèche, les biomasses sont d'abord lyophilisées, puis traitées par broyage. En revanche, pour la voie humide, les biomasses sont traitées dans leur état naturel, en utilisant les méthodes de l'extraction par solvant, le broyage, les ultrasons et les champs électriques pulsés.

L'utilisation d'une biomasse à l'état humide nécessite en amont de la laver avec de l'eau pure. Cette étape implique de laver la biomasse avec un petit volume d'eau pure, de l'agiter à l'aide d'un vortex, puis de la centrifuger pour séparer le surnageant. Le culot récupéré est ensuite utilisé pour les étapes suivantes. Ce lavage a permis de réduire la conductivité liée à l'ancien milieu de culture ce qui est nécessaire pour le prétraitement par champs électriques. Cela permet

également d'éliminer les pigments résiduels et les cellules mortes, évitant ainsi leur relargage potentiel. Suite à cela, le prétraitement ne s'applique qu'aux cellules restées intactes.

4.1 *Extraction au solvant*

Pour réaliser la cinétique d'extraction des caroténoïdes en fonction du temps, quatre solvants sont utilisés : l'éthanol 96%, l'acétone, le diméthylsulfoxyde (DMSO) et le méthanol. Un échantillon de biomasse, contenant 2 g de matière sèche, est d'abord mélangé avec un petit volume de solvant d'extraction. Ce mélange est ensuite transféré dans une fiole Erlenmeyer pour que le volume soit complété jusqu'à 200 mL avec le même solvant. L'extraction est réalisée sous une agitation continue à 200 rpm à l'aide d'un barreau aimanté. Pour prévenir la photo-oxydation, ainsi que l'évaporation du solvant, les fioles sont recouvertes avec du papier aluminium.

L'extraction est suivie par des prélèvements périodiques de 2 mL à des intervalles définis : après 15 minutes, 30 minutes, 1 heure, 2 heures, 3 heures et 24 heures. Ces échantillons sont ensuite centrifugés pendant 20 minutes à 10 000 rpm avant d'être analysés. Pour le dernier prélèvement, après 24 heures d'extraction, l'échantillon est centrifugé à 4600 rpm pendant 20 min pour permettre la quantification des pigments dans l'extrait du volume final.

4.2 *Extraction assistée par broyage à billes*

Pour l'extraction assistée par broyage à billes, deux modèles de broyeurs à billes sont utilisés : le FastPrep ou le RETCH Mixer (**Figure 18**). Les deux modèles de broyeur ont une efficacité similaire en ce qui concerne l'extraction finale des pigments lors des expériences. La méthode utilisée pour chaque modèle est détaillée ci-dessous.



Figure 18 : Modèles de broyeurs à billes : à droite le modèle RETCH Mixer MM 400, et à gauche le modèle MP Biomedicals FastPrep-24 TM 5G.

4.2.1 *Broyage à billes - modèle MP Biomedicals FastPrep-24 TM 5G*

Un échantillon lyophilisé, entre 5 et 50 mg, est broyé par le modèle « MP Biomedicals FastPrep-24 TM 5G ». Le broyage se déroule dans un tube en plastique qui contient 5 mL de solvant et, soit 14 billes en verre de 2-3 mm de diamètre, soit une quantité de 171 g de billes en Zirconium, en fonction de l'expérience. L'appareil est manuellement réglé à une vitesse de $6,5 \text{ m.s}^{-1}$ pour

un cycle comprenant 60 secondes de broyage suivies de 30 secondes de repos. Ce cycle est répété 4 à 8 fois, en fonction de l'expérience, puis l'échantillon est centrifugé à 10 000 rpm pendant 10 minutes. Enfin, le surnageant est analysé dès qu'il est séparé du culot et des billes.

4.2.2 Broyage à billes - modèle RETCH Mixer Mill MM 400

Un échantillon de biomasse humide de 0,1 g de matière sèche ou de 10 mg de biomasse lyophilisée est broyé dans un tube à vis par le modèle « RETCH Mixer Mill MM 400 », avec une bille en acier de 5 mm de diamètre et 1 mL de solvant. Ce broyage comprend des cycles d'une minute d'agitation suivies de 15 secondes de repos, pendant 15 minutes à une fréquence de 30 Hz. l'échantillon est ensuite centrifugé à 10 000 rpm pendant 20 minutes. Enfin, le surnageant est analysé dès qu'il est séparé du culot et de la bille. Cette méthode, ayant permis d'obtenir les teneurs maximales en pigments, est considérée comme la référence pour estimer la teneur totale en pigments dans le cadre de cette étude.

4.3 Extraction assistée par ultrasons

Un ultrasonicateur de 400 Watt (modèle UP-400S, Hielscher GmbH), est utilisé à une fréquence fixe de 24 kHz (**Figure 19**) . Les ondes ultrasons sont générées de manière continue et transmises au milieu liquide par une sonotrode de 14 mm de diamètre et 100 mm de longueur.

Initialement, un échantillon de biomasse contenant 2 g de matière sèche, est suspendu dans 200 mL d'eau. Cette suspension est ensuite homogénéisée grâce à un vortex, avant d'être versée dans le bécher à double paroi. Pour contrôler l'élévation de la température pendant le traitement, ce bécher est maintenu à une température basse de 5 °C. La sonication est effectuée pendant 5 à 20 minutes.

La biomasse traitée est ensuite centrifugée à 4600 rpm pendant 20 minutes afin de séparer le surnageant aqueux du culot (étape 1). Ce dernier est ensuite diffusé dans 200 mL de DMSO pour compléter l'extraction des pigments pendant 30 min à température ambiante, avec une agitation réglée à 200 rpm (étape 2). Enfin, l'échantillon est de nouveau centrifugé à 4600 rpm pendant 20 min afin de séparer le surnageant DMSO. Les pigments présents dans les deux extraits sont par la suite analysés. Le solvant DMSO est utilisé pour diluer l'extrait aqueux, permettant ainsi la quantification des pigments.



Figure 19 : Photo de l'ultrasonicateur (UP-400S, Hielscher GmbH)

4.4 *Extraction assistée par champs électriques pulsés*

Un générateur de champs électriques pulsés de 40 kV-10 kA (modèle Basis power electronics) a été utilisé pour travailler à une intensité de 10 kV/cm et à une fréquence maximale de 10 Hz pendant une durée de 10 ms. Le prétraitement est appliqué à une suspension de microalgues qui contient 2 g de matière sèche dans 250 mL d'eau pure. Cette suspension est préalablement homogénéisée grâce à un vortex, puis introduite dans une chambre cylindrique équipée de deux électrodes distantes de 2 cm (**Figure 20**).

Suite au prétraitement, la biomasse est mise à refroidir. Elle est ensuite centrifugée à 4600 rpm pendant 20 minutes afin de séparer le surnageant aqueux du culot (étape 1). Ce dernier est ensuite diffusé dans 200 mL de DMSO pour compléter l'extraction des pigments pendant 30 min à température ambiante, avec une agitation réglée à 200 rpm (étape 2). Enfin, l'échantillon est de nouveau centrifugé à 4600 g pendant 20 min afin de séparer le surnageant DMSO. Les pigments présents dans les deux extraits sont par la suite analysés. Le solvant DMSO est utilisé pour diluer l'extrait aqueux, permettant ainsi la quantification des pigments.



Figure 20 : Photo du générateur des champs électriques pulsés (Basis power electronics) à gauche, avec sa chambre cylindrique de traitement à droite.

5 Quantification des pigments

5.1 *Saponification chimique de l'astaxanthine estérifiée*

Les microalgues étudiées accumulent principalement l'astaxanthine sous formes d'esters (mono et di-ester) et peu sous forme libre. Or l'étalon d'astaxanthine, utilisé pour les analyses HPLC UV-DAD, est seulement composé de la forme libre. Par conséquent, il a d'abord fallu saponifier les extraits de pigments. Le protocole de saponification utilisé a été adapté des travaux de (Li et al., 2012; Su et al., 2018). Les meilleurs résultats ont été obtenus en mélangeant 1 mL d'extrait de pigments (dilué si nécessaire) avec 0,3 mL d'une solution de NaOH à 0,1 mol/L, préparée dans l'éthanol à 96% (m/v). Ce mélange a été laissé pendant 3 h à 4°C à l'abri de la

lumière. La saponification a ensuite été arrêtée en diluant un petit volume de l'extrait saponifié. Cette dilution a permis de se situer dans la gamme de mesure de la méthode HPLC-UV.

5.2 Quantification des pigments par HPLC-UV DAD

L'extrait pigmentaire est placé dans un vial ambré puis analysé par une chaîne HPLC Ultima 3000 en phase inverse sur une colonne C18 (diamètre=4,6 mm, longueur=150 mm, granulométrie=3 µm, porosité=120 Å). L'appareil est couplé à un détecteur UV à barrettes de diode, qui est combiné à deux lampes : une lampe qui détecte les longueurs d'onde dans l'ultraviolet (190 à 360 nm), et une lampe qui détecte les longueurs d'onde dans le visible (360 à 800 nm) (Thermo Fisher Scientific).

Les chlorophylles a et b sont détectées à une longueur d'onde de 650 nm, la lutéine, la zéaxanthine, la violaxanthine à 450 nm, et l'astaxanthine pure, la canthaxanthine et l'adonixanthine à 470 nm. Tous les pigments, exceptés la canthaxanthine et l'adonixanthine, ont un étalon référant à l'HPLC (Sigma-Aldrich). Le volume d'injection est de 5 µL. Les pigments sont élués par un gradient isocratique d'une phase mobile de méthanol pur. Le débit est de 0,3 mL/min, la séparation des pigments se fait à une température de 4 °C et l'analyse dure 40 minutes au total.

Les concentrations respectives de la canthaxanthine et de l'adonixanthine sont déterminées en utilisant la droite d'étalonnage, qui relie l'aire du pic à la concentration de l'astaxanthine en HPLC-UV (**Figure 21**). En effet, les deux caroténoïdes, canthaxanthine et adonixanthine, sont très proches, d'un point de vue chimique, de l'astaxanthine en termes d'absorbance maximale et de spectre d'absorption. La canthaxanthine, qui a deux groupements cétoniques et pas de groupements hydroxyles, est un précurseur de l'astaxanthine selon la voie métabolique décrite en chapitre bibliographique. L'adonixanthine, qui a un groupement cétonique et deux groupements hydroxyles, est synthétisé par certaines microalgues psychrophiles (Doppler et al., 2022). Dans l'éluant méthanol, l'astaxanthine à son maximum d'absorption a un coefficient d'extinction molaire $\varepsilon = 125,16$ L/mol/cm, qui est très proche de celui de la canthaxanthine $\varepsilon = 117,88$ L/mol/cm (Kawasaki et al., 2023). Ainsi, la droite d'étalonnage d'astaxanthine est utilisée pour déterminer une concentration équivalente en astaxanthine (en mg/L) à partir de l'aire de la canthaxanthine et de l'adonixanthine, selon l'équation suivante :

$$Teneur (mg/L) = \frac{Aire \times pente_{astax} \times \varepsilon_{astax}}{\varepsilon} \quad (Eq. 5)$$

Avec :

ε : coefficient d'extinction molaire de la canthaxanthine ou de l'adonixanthine (L/mol/cm).

ε_{astax} : coefficient d'extinction molaire de l'astaxanthine (L/mol/cm).

pente astax : pente de la droite d'étalonnage de l'astaxanthine (L/mol/cm).

La mise en œuvre de la méthode, l'analyse et l'interprétation des données ont été réalisées à l'aide du logiciel Chromeleon™ 6.8. Enfin, les concentrations, obtenues en mg/L d'extrait, sont converties en mg/g de matière sèche selon l'équation suivante :

$$Teneur\ en\ pigment\ (mg/g\ MS) = \frac{Teneur\ en\ pigment\ (mg/L)}{Teneur\ en\ masse\ sèche\ (g/L)} \quad (Eq. 4)$$

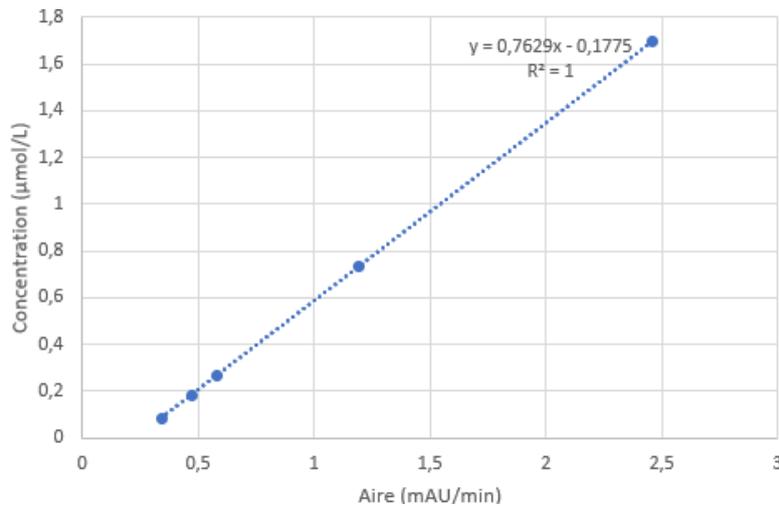


Figure 21 : Courbe d'étalonnage de l'astaxanthine pure pour la quantification par HPLC-UV.

5.3 Quantification des pigments par spectrophotométrie

5.3.1 Chlorophylles et caroténoïdes totaux

La concentration des pigments est déterminée dans les extraits en utilisant les équations de (Lichtenthaler & Buschmann, 2001; Wellburn, 1994). Ces équations sont utilisées pour calculer la concentration des chlorophylles a et b, ainsi que des caroténoïdes totaux, à partir de mesures d'absorbance de l'extrait en tenant compte du type de solvant utilisé (**Tableau 11**).

Pour réaliser les mesures, chaque extrait de pigments est placé dans une cuvette en quartz (Hellma 100-QS, 10 mm de largeur). Par la suite, le spectre d'absorbance, compris entre 350 et 800 nm, est obtenu pour faire les différents calculs. Les concentrations sont obtenues en mg/L d'extrait puis elles sont converties en mg/g de matière sèche de la même manière que la teneur en pigments dans la méthode de quantification par HPLC-UV.

Tableau 11 ; Équations de (Lichtenthaler & Buschmann, (2001) et de Wellburn, (1994) utilisées pour calculer la concentration des chlorophylles a et b, et des caroténoïdes totaux.

Solvant	Concentration en mg/L d'extrait		
	[Chlorophylle a]	[Chlorophylle b]	[Caroténoïdes totaux]
Éthanol	$13,36 A_{664} - 5,19 A_{648}$	$27,43 A_{648} - 8,12 A_{664}$	$(1000 A_{470} - 2,13 C_a - 97,64 C_b)/209$
DMSO	$12,19 A_{665} - 3,45 A_{649}$	$21,99 A_{649} - 5,32 A_{665}$	$(1000 A_{480} - 2,14 C_a - 70,16 C_b)/220$
Méthanol	$16,72 A_{664} - 9,16 A_{649}$	$34,09 A_{649} - 15,28 A_{664}$	$(1000 A_{470} - 1,63 C_a - 104,96 C_b)/221$
Acétone	$11,24 A_{664} - 2,04 A_{649}$	$20,13 A_{649} - 4,19 A_{664}$	$(1000 A_{470} - 1,9 C_a - 63,14 C_b)/214$

Avec :

A_λ : absorbance mesurée aux longueurs d'onde de 648, 649, 664, 665, 470 et 480 nm.

C_a et C_b : concentration en chlorophylle a et b , exprimée en mg/L d'extrait, respectivement.

5.3.2 Astaxanthine totale

Afin de quantifier l'astaxanthine totale dans les extraits, c'est-à-dire la forme libre, les formes estérifiées et les isomères, une courbe d'étalonnage est établie dans le solvant DMSO. Cette courbe relie l'absorbance à 530 nm à la concentration du standard d'astaxanthine pure. Le choix de la longueur d'onde de 530 nm est basé sur les recherches de (Casella et al., 2020; Su et al., 2018). Ces auteurs ont trouvé que cette longueur d'onde permet d'éviter l'interférence de la lutéine et d'autres caroténoïdes lors de la mesure de l'absorbance par spectrophotométrie des extraits d'*H.pluvialis*.

En outre, deux autres courbes d'étalonnage sont également tracées à partir des absorbances relevées à 470 nm et 490 nm de l'astaxanthine. La courbe de l'absorbance à 470 nm est utilisée pour estimer la concentration en caroténoïdes totaux (primaires et secondaires), exprimée en équivalent d'astaxanthine, tandis que la courbe d'absorbance à 490 nm est utilisée pour estimer la concentration en caroténoïdes secondaires en équivalent d'astaxanthine.

Une cuvette en quartz (Hellma 100-QS, 10 mm de largeur) est utilisée pour effectuer l'analyse spectrophotométrique. Un balayage spectral dans le domaine de 350 à 800 nm est fait pour enregistrer les spectres d'absorption, après avoir calibré l'appareil avec un blanc correspondant au solvant utilisé. Les concentrations sont exprimées en mg/L d'extrait puis elles sont converties en mg/g de matière sèche de la même manière que celle dans la méthode de quantification par HPLC-UV.

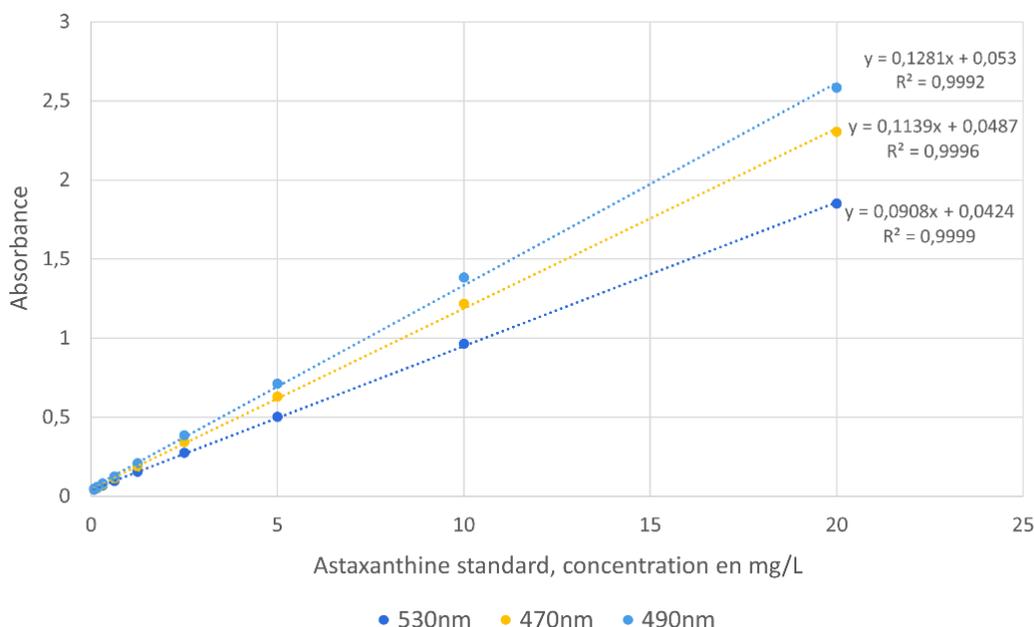


Figure 22 : Courbes d'étalonnage d'astaxanthine standard préparé dans le DMSO, pour la quantification par la méthode spectrophotométrique.

5.4 Séparation qualitative des caroténoïdes par CCM et HPTLC

La séparation des caroténoïdes est réalisée à l'aide de l'appareil de modèle « CAMAG Automatic TLC Sampler ATS 4 ». L'application des échantillons sur une plaque de 200 mm x 100 mm, de type Merck, HPTLC Silica gel 60 F₂₅₄ est effectuée de manière semi-automatique. Le volume d'injection est de 8 µL. Le développement de la plaque est réalisé dans une cuve, saturée avec un mélange de solvants : le n-hexane et l'éthyle d'acétate, dans un ratio de 30:20 (v/v), utilisés comme éluant. Après son développement, la plaque est séchée puis elle est analysée dans le scanner pour une détection à 254 nm. La mise en œuvre de la méthode, l'analyse et l'interprétation des données sont réalisées à l'aide du logiciel VisionCATSuser.

Pour séparer les formes d'astaxanthine libre et estérifiée, une chromatographie sur couche mince (CCM) est effectuée sur la même qualité de plaque qu'en HPTLC. L'éluant est un mélange de deux solvants : l'acétone et le n-hexane, dans un ratio de 30:70 (v/v). Un petit volume d'extrait est manuellement déposé à l'aide d'un capillaire sur la ligne de départ dessinée. Une fois la migration maximale atteinte (après environ 15 minutes), la plaque est laissée pour séchage sous la sorbonne chimique. Enfin, elle est observée sous une lampe UV à 254 nm placée dans un box à l'abri de la lumière.

5.5 Quantification des acides gras par GC-MS

Le dosage des acides gras est réalisé par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-2010 Plus Shimadzu, référence GSMS-TQ8050). Pour ce dosage, les acides gras sont d'abord transméthylés. Le protocole est le suivant : une quantité de 5 à 8 mg d'échantillon lyophilisé est pesée directement dans un vial ambré. Un volume de 29 µL d'une solution étalon de C13:0 à 1,4 g/L est ajouté, ainsi que 200 µL de chloroforme-méthanol (2:1, v/v) et 300 µL d'acide chlorhydrique:méthanol à 0,6 M. Les bouchons doivent être sertis sur les vials des échantillons. Ces derniers sont ensuite agités pendant une heure à 85 °C avec un agitateur thermique (Thermal Shake lite VWR) à une vitesse de 500 vibrations par minute. Une fois refroidi, 1 mL d'hexane est ajouté pour obtenir deux phases : une phase polaire et une phase apolaire, en passant par une légère agitation des vials au vortex. La séparation de ces phases s'effectue à température ambiante, la phase apolaire contenant l'hexane et les acides gras, est transférée dans un autre vial pour être analysée. Les résultats qualitatifs et quantitatifs sont analysés via le logiciel LabSolution GC. La teneur en acides gras est exprimée en mg/g MS et calculée de la même manière que la teneur en pigments dans la méthode de quantification par HPLC-UV.

Pour

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Section 1 : Étude de la culture des souches psychrophiles en phase verte

1 Introduction

Cette première section est consacrée à la première étape de la culture, connue sous le nom de phase verte, des deux souches psychrophiles sélectionnées, *Pleurastrum sp.* et *Sphaerocystis sp.* Elle se divise en deux parties principales :

- la première partie porte sur des tests préliminaires visant à acclimater les souches psychrophiles. Ces tests sont essentiels pour adapter les souches aux conditions de culture choisies.
- la deuxième partie se focalise sur l'analyse de l'effet des conditions de culture sur la croissance. L'objectif est d'améliorer la productivité en biomasse en modifiant les conditions opératoires. Plus précisément, cette partie consiste à étudier l'influence de la variation de l'intensité lumineuse, de la température et de la source de carbone.

2 Méthodologie

2.1 Choix des conditions opératoires

Les deux souches étudiées, *Sphaerocystis sp.* et *Pleurastrum sp.*, ont été conservées et inoculées sur un milieu liquide BBM à leur stade cellulaire vert. Elles ont ensuite été ensemencées sur un milieu solide de BBM enrichi de gélose, dans un tube en verre (**cf. Matériels et Méthodes**). Cette étape de préparation initiale effectuée par le fournisseur a permis de stimuler la croissance des deux souches microalgales. Suite à leur réception, une seconde étape a été entreprise pour acclimater ces souches aux conditions de notre laboratoire. Cela impliquait leur adaptation à des conditions standards de température et de lumière, ainsi que la présélection des milieux de culture appropriés pour favoriser leur croissance lors des expériences ultérieures.

Selon les fiches descriptives de *Pleurastrum sp.* et de *Sphaerocystis sp.*, il est indiqué qu'elles ont des températures optimales respectives de 8 °C et de 14 °C. Pour la culture en phase verte, les deux températures, 12 °C et 14 °C, ont été choisies car elles se situent dans la plage optimale et sont conformes à la définition des microalgues psychrophiles donnée par (Cvetkovska et al., 2017). En ce qui concerne l'intensité lumineuse, l'éclairage artificiel a été varié entre 39 et 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, selon l'expérience. Ces valeurs sont conformes à ce qui est généralement utilisé dans le contexte de la culture en phase verte de *H.pluvialis* et de *C.zofingiensis* où l'éclairage se situe entre 40 et 120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, comme travaillé par (Mao et al., 2018; Sun et al., 2017).

Le milieu de culture BBM utilisé a été modifié en fonction des expériences et de la souche. Dans le cas de *Pleurastrum sp.*, il a été observé que le milieu contenant du bicarbonate favorise la multiplication des floes durant sa croissance en phase verte, d'où son utilisation. Pour toutes les expériences menées, l'agitation des cultures a été fixée à 120 rpm.

2.2 Tests préliminaires d'adaptation

Ces premiers tests visaient à obtenir des premières données quantitatives sur la croissance des deux souches psychrophiles en se référant à celles obtenues dans l'article de (Leya et al., 2009). Pour chaque souche, deux précultures ont été rassemblées d'un volume initial de 80 mL qui a ensuite été porté à 250 mL par l'ajout du milieu B3N dans une fiole Erlenmeyer de 500 mL. Dans le cas de la souche *Pleurastrum sp.*, le milieu B3N utilisé avait une concentration en bicarbonate de sodium de 2,8 g/L. Cette fiole dite « culture mère » a été ensuite divisée en 8 cultures filles identiques de 25 mL dans des Erlenmeyers de 50 mL. La matière sèche et la concentration en nutriments ont été mesurées en utilisant les 50 mL restant de culture mère, pour chaque souche.

Ce test a été réalisé à une température standard de 12 °C en utilisant un incubateur Thermo Scientific MaxQ 8000. Le brassage de l'air à l'intérieur de cet appareil assurait une concentration de CO₂ proche de celle de l'atmosphère, soit environ 0,04%. Un faible éclairage a été fourni grâce à une lampe placée à l'intérieur de l'incubateur. Cette lampe a été programmée pour éclairer selon un cycle de 20 heures de jour avec une intensité lumineuse comprise entre 80 et 100 µmol/m²/s et 4 heures de nuit.

Pour suivre la croissance des deux souches, des prélèvements ont été effectués chaque semaine. Les paramètres suivis étaient la DO à 800 nm, la matière sèche, la concentration de nutriments dans le milieu de culture et l'aspect visuel des cellules au microscope optique des cellules.

Le test a duré 28 jours dans le photo-incubateur. Il est à noter que la croissance de *Pleurastrum sp.* ne peut pas être suivie par la mesure de la DO en raison de sa croissance sous forme de flocs (milieu fortement hétérogène). Pour *Sphaerocystis sp.*, l'ajout de vitamines a été nécessaire dès la première semaine de culture pour booster les divisions cellulaires.

2.3 Amélioration des conditions de croissance en phase verte

La seconde partie de cette section vise à identifier des meilleures conditions de croissance dans un environnement rigoureusement contrôlé. Pour cela, des variations de paramètres opératoires, tels que l'intensité lumineuse, la température, le taux de CO₂ et les nutriments du milieu de culture, appliquées sous forme de combinaisons sont étudiées. L'objectif est de comprendre comment ces variations influencent la croissance et le développement des microalgues sélectionnées. Pour cette étude, une combinaison de conditions sera considérée comme améliorée, pour chacune des deux microalgues si elle stimule de manière significative la production de biomasse, et permet d'envisager facilement la transition vers la phase rouge de stress, qui sera abordée dans la section suivante.

Pour cette étude, les fioles Erlenmeyers sont placées dans un photo-incubateur (Infors HT Minitron) sous un éclairage continu. Les six combinaisons spécifiques, désignées par les lettres A à F, sont résumées dans le **Tableau 12**. Les densités optiques (DO) initiales à 800 nm, ainsi que le volume de culture, sont également indiqués dans ce tableau.

Pour ces expériences, le milieu de culture BBM a été utilisé. Sa composition riche permet de maintenir les cultures en phase verte pendant une durée maximale de deux semaines, ce qui facilite leur suivi. Le taux de CO₂ a été ajusté entre 1% et 2%, l'éclairage artificiel a été varié entre 39 et 78 µmol/m²/s et la température entre 12 °C et 14 °C, selon l'expérience menée.

Parmi les six combinaisons étudiées, la condition A se distingue par des paramètres spécifiques. Plus précisément, elle a été réalisée avec un volume de culture de 50 mL et une DO initiale de 0,05 à 800 nm. Par contre, pour les autres cultures de B à F, le volume était doublé, soit 100 mL, et la DO initiale était quatre fois plus élevée, soit 0,2 à 800 nm. L'augmentation du volume a facilité le prélèvement des échantillons pour mesurer la matière sèche, tout en minimisant l'impact sur le volume de la culture et en évitant de soumettre la culture à un stress potentiel.

Les paramètres suivis étaient la DO à 800 nm, la matière sèche, la concentration de nutriments dans le milieu de culture et l'aspect visuel des cellules au microscope optique.

Tableau 12 : Les six combinaisons de conditions opératoires, de A à F, étudiées pour améliorer la croissance des deux microalgues psychrophiles. B : bicarbonate de sodium.

Conditions opératoires					
Combinaison	Température (°C)	CO ₂ (%)	Intensité lumineuse (µmol/m ² /s)	Volume de culture (mL)	DO _{800nm} initiale
A	12	1%	39	50	0,05
B	12	1%	49	100	0,4
C	12	1%	78	100	0,2
D	12	2%	78	100	0,3
E	12	2%+B	78	100	0,4
F	14	1%	78	100	0,2-0,4

La comparaison des résultats obtenus aux différentes combinaisons a permis d'étudier l'effet de l'intensité lumineuse (A+B+C), de la température (C+F) et de la source de carbone (C+D+E) sur la croissance des deux souches en phase verte, tels que illustrée dans la **Figure 23**.

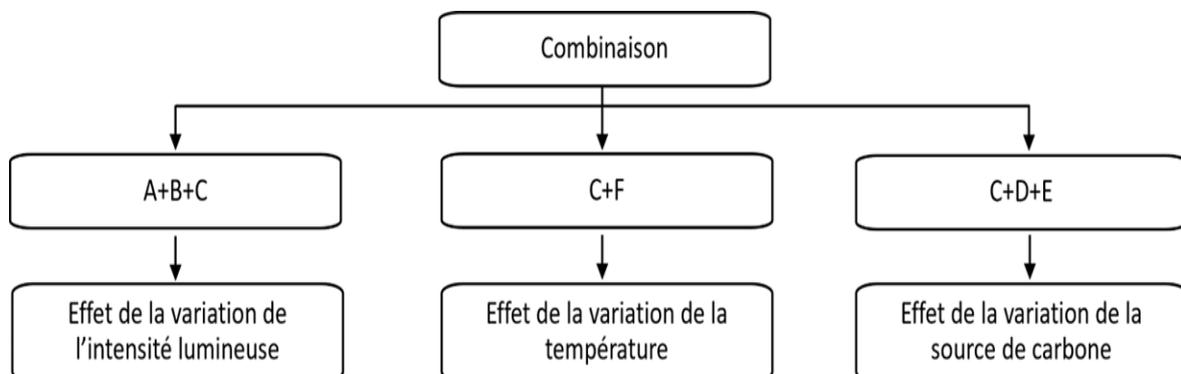


Figure 23 : Diagramme illustrant les combinaisons opératoires pour étudier l'effet des paramètres sur la croissance de *Sphaerocystis sp.* et de *Pleurastrum sp.* durant la phase verte.

3 Résultats de l'adaptation des souches

3.1 *Pleurastrum sp.*

L'évolution de la matière sèche et de la concentration des nutriments dans le milieu en fonction du temps lors de la croissance de *Pleurastrum sp.* sont illustrées dans la Figure 24. Au cours des quatre semaines de culture, deux phases distinctes de croissance sont observées : une phase d'adaptation (ou latence) pendant les deux premières semaines, suivie d'une phase de croissance exponentielle lors des deux semaines suivantes.

En moyenne, la concentration de matière sèche a connu une augmentation significative, passant de 0,25 g/L à 0,75 g/L au 28^{ème} jour de culture. Cependant, en raison d'une hétérogénéité marquée du milieu, principalement due à la croissance de *Pleurastrum sp.* sous forme de floccs, il est possible que la concentration de matière sèche ait été surestimée aux 7^{ème} et 28^{ème} jours.

Parallèlement à cette croissance, une consommation modérée a été observée de deux nutriments essentiels: le nitrate et le phosphate. Leur concentration initiale a seulement diminué d'environ 10% après 28 jours de culture. En ce qui concerne le sulfate, sa consommation a été négligeable puisque sa concentration est restée stable dans le milieu de culture.

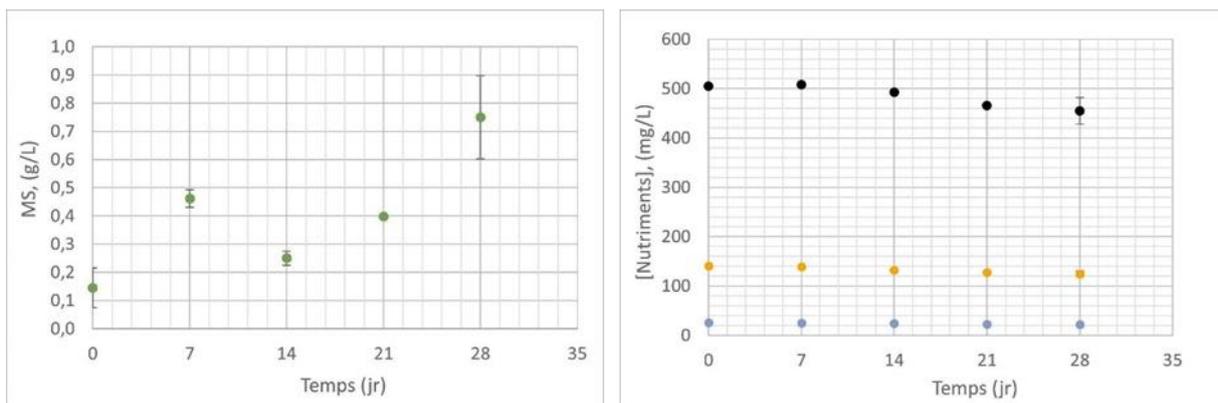


Figure 24 : Suivi des paramètres de croissance de *Pleurastrum sp.*: l'évolution de MS (●) et de la concentration des nutriments NO₃⁻(●), PO₄³⁻(●), et SO₄²⁻(●), dans le milieu de culture en fonction du temps. Les barres d'erreur indiquent les écart types entre les duplicatas.

Nous avons déterminé le taux de croissance de *Pleurastrum sp.* à 0,08 jour⁻¹, pendant sa phase de croissance exponentielle, du 14^{ème} au 28^{ème} jour. Ce taux est 2,5 fois plus faible que celui rapporté par Leya et al., (2009). Il convient de souligner que nos conditions opératoires, notamment en termes de température et d'intensité lumineuse, diffèrent de celles de l'étude antérieure. La souche a été cultivée à une température de 10 °C et une intensité lumineuse comprise entre 120-220 μmol/m²/s. Nous suggérons que ces modifications apportées aux conditions opératoires pourraient être l'origine de la différence observée dans le taux de croissance. De plus, l'adaptation de la souche après une longue période de conservation pourrait également avoir influencé nos résultats.

3.2 *Sphaerocystis sp.*

L'évolution de la MS, de la DO à 800 nm et de la concentration en nutriments dans le milieu en fonction du temps lors de la croissance de *Sphaerocystis sp.* sont illustrées dans la **Figure 25**.

Tout d'abord on remarque que la MS et DO à 800 nm ont une évolution similaire au cours des quatre semaines de croissance. Pour la souche *Pleurastrum sp.* en tenant en compte les barres d'erreur, deux phases de croissance ont été mises en évidence : une phase d'adaptation pendant les deux premières semaines suivie d'une phase de croissance exponentielle lors des deux semaines subséquentes. Il est à noter que le développement de la souche *Sphaerocystis sp.* s'est déroulé sous forme de cellules en suspension, au contraire de *Pleurastrum sp.* en floccs.

La DO a ainsi augmenté de 0,08 à 0,12 après les deux premières semaines, avec une 1^{ère} phase marquée par l'ajout de vitamines à la fin de la première semaine. A partir de la 3^{ème} semaine, la croissance s'accélère pour atteindre une valeur de 0,2 au 28^{ème} jour, marquant la 2^{ème} phase. Quant à la matière sèche, elle a augmenté lentement de 0,07 g/L à 0,27 g/L lors des deux premières semaines (1^{ère} phase), puis plus rapidement à partir de la 3^{ème} semaine pour atteindre 0,57 g/L au 28^{ème} jour (2^{ème} phase).

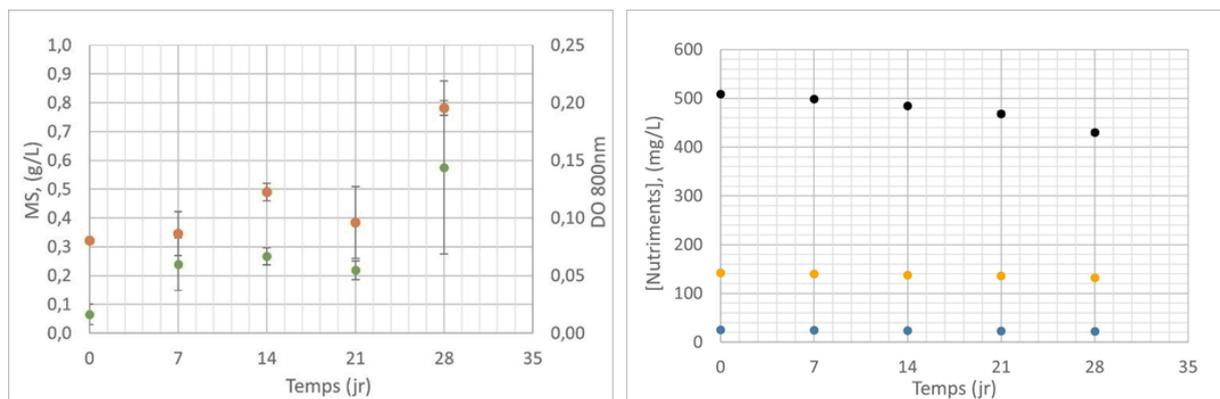


Figure 25 : Suivi de la croissance de *Sphaerocystis sp.*: évolution de la MS (●), de la DO (●) et de la concentration en nutriments NO₃⁻(●), PO₄³⁻(●), et SO₄²⁻(●), dans le milieu de culture en fonction du temps. Les barres d'erreur indiquent les écart types entre les duplicatas.

Par ailleurs, une consommation relativement faible de deux nutriments essentiels est mesurée : le nitrate et le phosphate. Au 28^{ème} jour, leur teneur a diminué de 14% et 5%, respectivement. Quant au sulfate, sa consommation a été pratiquement nulle pendant les 4 semaines, car sa concentration dans le milieu est restée constante.

À titre comparatif, nous avons déterminé deux taux de croissance en suivant l'évolution de DO. Au cours de la 1^{ère} phase, entre le 7^{ème} et le 14^{ème} jour, nous avons établi un taux de croissance de 0,05 jour⁻¹. Pendant la 2^{ème} phase, qui s'étend du 21^{ème} au 28^{ème} jour, nous avons noté une légère augmentation du taux de croissance, atteignant une valeur de 0,11 jour⁻¹. Nos résultats sont inférieurs au taux de croissance de 0,5 jour⁻¹ rapporté par Leya et al., (2009). Comme nous l'avons expliqué précédemment pour la souche *Pleurastrum sp.*, il semble que les modifications que nous avons apportées à la température et à l'intensité lumineuse soient l'origine de la différence observée dans le taux de croissance.

3.3 Description morphologique des deux microalgues

Au cours des quatre semaines d'adaptation, la croissance de *Pleurastrum sp.* et de *Sphaerocystis sp.* a été suivie à la fois au microscope optique et par une surveillance visuelle de leur développement dans les fioles Erlenmeyers. La **Figure 26** présente des photographies de ces deux cultures de microalgues.

La souche *Pleurastrum sp.* s'est développée principalement en formant des floccs. Leur observation a révélé un regroupement de cellules matures immobiles, connues sous le nom de caenoblastes. Ces cellules, qui représentent le stade de maturité de la souche, sont atteints après un stade de zoospores, rarement aperçus en mobilité sur la lame. Le diamètre des zoospores varie apparemment entre 5 à 10 μm , puis ils s'agrègent pour former des cellules matures, qui sont immobiles et dont le diamètre est compris entre 15 à 20 μm . Le pyrénioïde et la chloroplaste peuvent être observés dans le cytoplasme cellulaire.

Dans notre observation de *Sphaerocystis sp.*, les cellules vertes apparaissent mobiles lors des divisions cellulaires, avec un diamètre qui varie de 5 à 10 μm . Le pyrénioïde et la chloroplaste peuvent être observés dans le cytoplasme cellulaire. Ces cellules semblent finir par s'agréger pour former des cellules matures immobiles. Cependant, nous avons souvent observé que lorsque les divisions cellulaires cessent, de nombreuses cellules adoptent une forme immobile que nous avons appelée "en fleur", tel qu'indiqué par les flèches noires sur la photo dans la **Figure 26**.

Cette forme cellulaire a été considérée comme un état de stress dans la culture qui prenait une couleur brune, signe d'une accumulation potentielle de caroténoïdes de stress (début de la phase rouge). En effet, l'ajout d'un mélange de vitamines aux cultures a eu un effet positif en stimulant à nouveau les divisions cellulaires, favorisant ainsi le développement de la microalgue lors de la phase verte. Cette approche a déjà été mise en œuvre pour prévenir la mort cellulaire durant la conservation des souches psychrophiles lors du transport depuis leur banque d'origine.

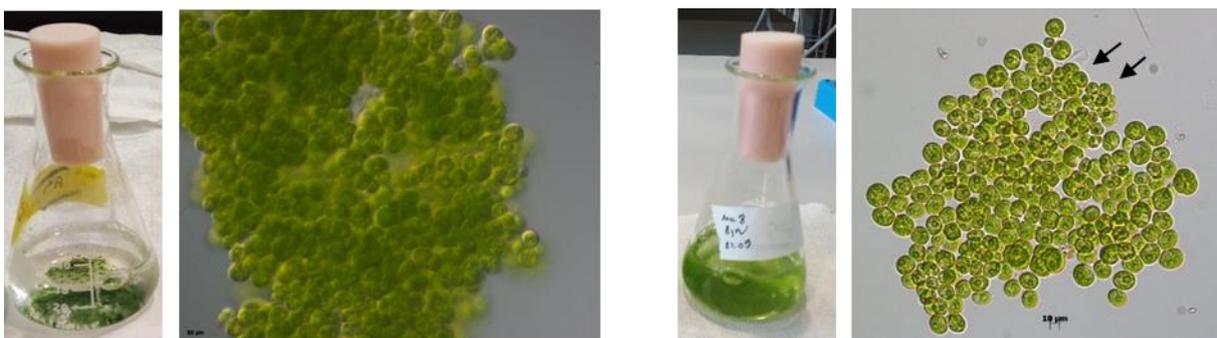


Figure 26 : À gauche : photographie de *Pleurastrum sp.* cultivée en fiole Erlenmeyer, et observation au microscope optique (x400) révélant un flocc composé de « caenoblastes ». À droite : photographie de *Sphaerocystis sp.* cultivée en fiole Erlenmeyer, et observation au microscope optique (x400) montrant différentes formes cellulaires. Les flèches noires indiquent des cellules présentant une forme dite « en fleur ».

Ces changements morphologiques cellulaires sont comparables à ceux observés chez une autre souche psychrophile *Coelastrella terrestris* WP154.1 étudiée dans (Doppler et al., 2022). Également, chez *H. pluvialis* qui possède un cycle de vie complexe, est caractérisé par plusieurs stades cellulaires. Brièvement, elle produit des zoospores mobiles mesurant entre 10-20 μm . Plusieurs zoospores sont ensuite contenues dans des sporangiums, formant ainsi des cellules dites « palmelas », qui sont immobiles et mesurant entre 20 à 40 μm . Ces palmelas représentent le stade cellulaire de maturité (voir **Figure 6**)

La compréhension des changements morphologiques s'est révélée essentielle lors de l'adaptation aux conditions opératoires initiales (12°C, 80 à 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, environ 0,04% de CO_2 sur un milieu B3N modifié en fonction de la souche). Ces expériences ont permis d'observer le comportement et le développement des souches sélectionnées pendant la première phase de croissance. De plus, les informations recueillies ont servi de base pour concevoir des expériences ultérieures plus approfondies dans le cadre de l'étude paramétrique suivante

4 Résultats de l'amélioration des conditions de croissance

4.1 *Pleurastrum sp.*

Le **Tableau 13** présente les taux de croissance estimés pour toutes les conditions entre le 1^{er} et le 8^{ème} jour, les matières sèches intermédiaires et finales, la productivité en fonction des conditions opératoires de A à F.

Tableau 13 : Suivi de la croissance de *Pleurastrum sp.* en fonction des conditions opératoires

Paramètres	Conditions					
	A	B	C	D	E	F
μ (j^{-1}) estimé	0,35	0,11	0,18	0,23	0,18	0,14
MS intermédiaire (g/L)	non mesurée	0,3±0,07 (j4)	0,3±0,03 (j3)	0,6±0,01 (j4)	0,7±0,03 (j6)	0,3±0,03 (j3)
MS finale (g/L) (j11)	0,7±0,05	0,5±0,17	0,6±0,05 (j10)	1,2±0,05	1,32±0,03 (j12)	0,9±0,11 (j10)
Productivité en MS (g/L/j)	0,25	0,06	0,11	0,28	0,24	0,13

4.1.1 Effet de la température : conditions C et F

Suite à une phase de latence rapide, la DO a connu une augmentation significative dans les deux conditions de température. Nous avons constaté qu'à 12°C (condition C), la DO a presque triplé par rapport à sa valeur initiale, passant de 0,26 à 1,18. De même, à 14°C (condition F), la DO a plus que doublé par rapport à sa valeur initiale, évoluant de 0,42 à 1,1.

Néanmoins, les taux de croissance estimés pour ces conditions étaient pratiquement proches, 0,14-0,18 jour⁻¹. De la même manière, les productivités en matière sèche étaient également comparables, avec des valeurs respectives de 0,11 et 0,13g/L/j.

Malgré une similitude remarquée dans les matières sèches intermédiaires, établie à 0,3 g/L, la matière sèche finale à 14 °C a surpassé un peu celle obtenue à 12 °C, avec des valeurs respectives de 0,94 g/L et 0,6 g/L.

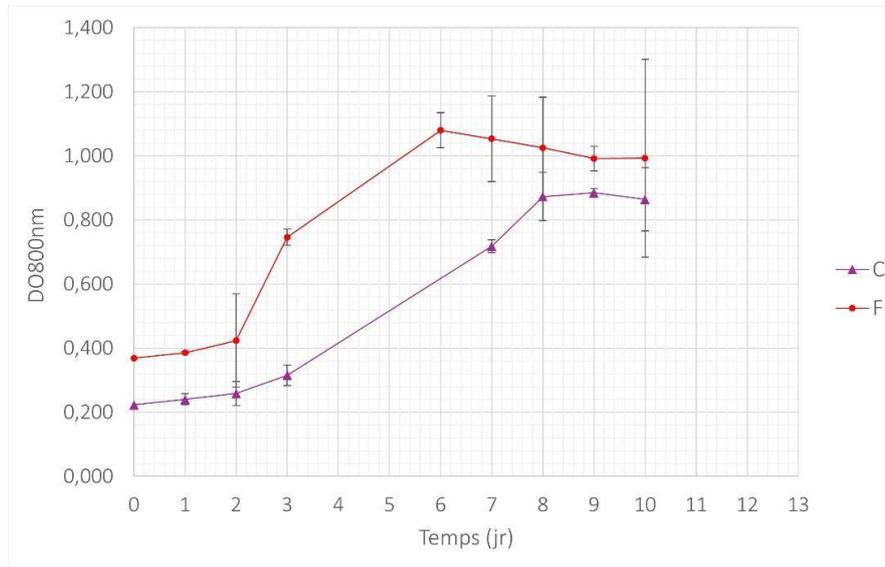


Figure 27 : Courbes de croissance de *Pleurastrum sp.* dans les conditions opératoires C et F et en fonction du temps. Les barres d'erreur indiquent les écarts types entre les triplicatas.

Sous les deux conditions de températures, *Pleurastrum sp.* a épuisé l'intégralité du nitrate initial présent dans le milieu, soit une consommation linéaire de 180 mg/L à la fin de la phase exponentielle de croissance. En ce qui concerne le phosphate, *Pleurastrum sp.* a montré une consommation linéaire pendant la phase de croissance exponentielle, suivie d'une stabilisation de la concentration pendant les derniers jours de croissance. Entre 35-41% de la concentration initiale de phosphate dans le milieu a été absorbée. Pour le sulfate, la microalgue a consommé 63 à 69% de la concentration initiale au 10^{ème} jour qui marque la fin de la culture. Il semble que cette consommation aurait pu continuer jusqu'à l'épuisement du sulfate.

Notre expérience a confirmé que *Pleurastrum sp.* peut se développer à des températures de 12°C (température initiale d'adaptation) et 14 °C, dans sa plage de température optimale de 2°C à 18°C. En comparant nos résultats à ceux de Leya et al., (2009), nous constatons que notre taux de croissance à 12 °C est presque équivalent à leur taux de 0,2 jour⁻¹, bien qu'ils l'aient obtenu à une température de 10 °C, dans un milieu BBM avec une concentration de nitrate trois fois supérieure, et à une intensité lumineuse comprise entre 120-220 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Ces observations suggèrent que la température et la concentration de nitrate dans le milieu pourraient avoir un impact notable sur le taux de croissance de *Pleurastrum sp.* De la sorte, même si les taux de croissance et les productivités obtenus dans notre expérience sont assez similaires dans notre expériences, il apparaît que la souche se développe de manière plus optimale à 12 °C dans nos conditions expérimentales.

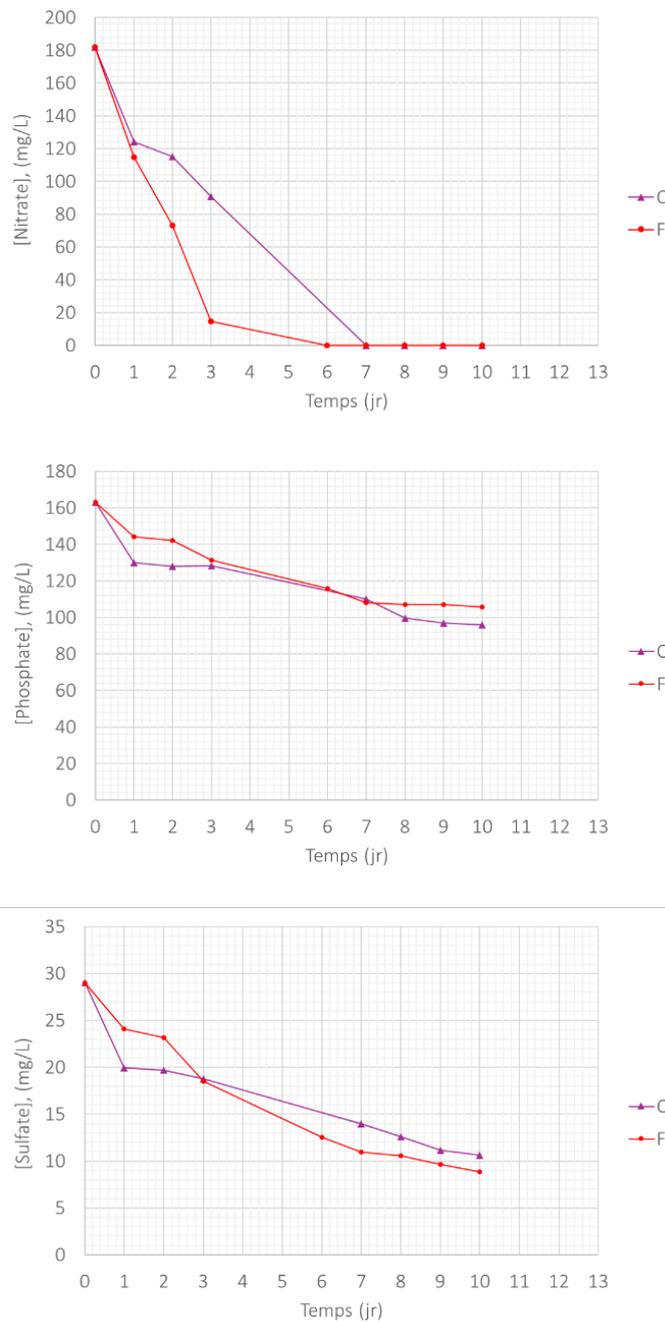


Figure 28 : Courbes de suivi des concentrations des nutriments lors de la croissance de *Pleurastrum sp.* en fonction des conditions opératoires C et F et en fonction du temps.

4.1.2 Effet de l'intensité lumineuse : conditions A, B et C

Les conditions A, B et C ont été comparées afin d'étudier l'influence de l'intensité lumineuse sur la croissance, malgré l'écart de DO initiale et de volume initial (**Tableau 12**). Une augmentation significative de la DO a été observée dans chaque condition. Sous une intensité lumineuse minimale de $39 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (condition A), la DO a presque décuplé, passant de 0,1 à 1,1. À une intensité lumineuse légèrement supérieure de $49 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (condition B), la DO a enregistré une augmentation modérée, évoluant de 0,5 à 1,1. Enfin, à l'intensité maximale de $78 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (condition C), l'augmentation de la DO a été plus faible, passant de 0,3 à 0,9.

Sous une intensité lumineuse minimale (A), nous avons estimé le taux de croissance et la productivité en matière sèche les plus élevés, soit 0,35 jour⁻¹ et 0,25 g/L/j, respectivement. Par contre, à l'intensité lumineuse maximale (C), le taux de croissance a été de 0,18 jour⁻¹, et la productivité de 0,11 g/L/j. Ces valeurs semblent être comparables à celles obtenus à une intensité légèrement supérieure (B), où le taux de croissance était de 0,11 jour⁻¹ et la productivité de 0,06 g/L/j. Indépendamment de l'intensité lumineuse, les trois niveaux testés (39, 49 et 78 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) ont conduit à une production finale de biomasse similaire, 0,5-0,7 g/L.

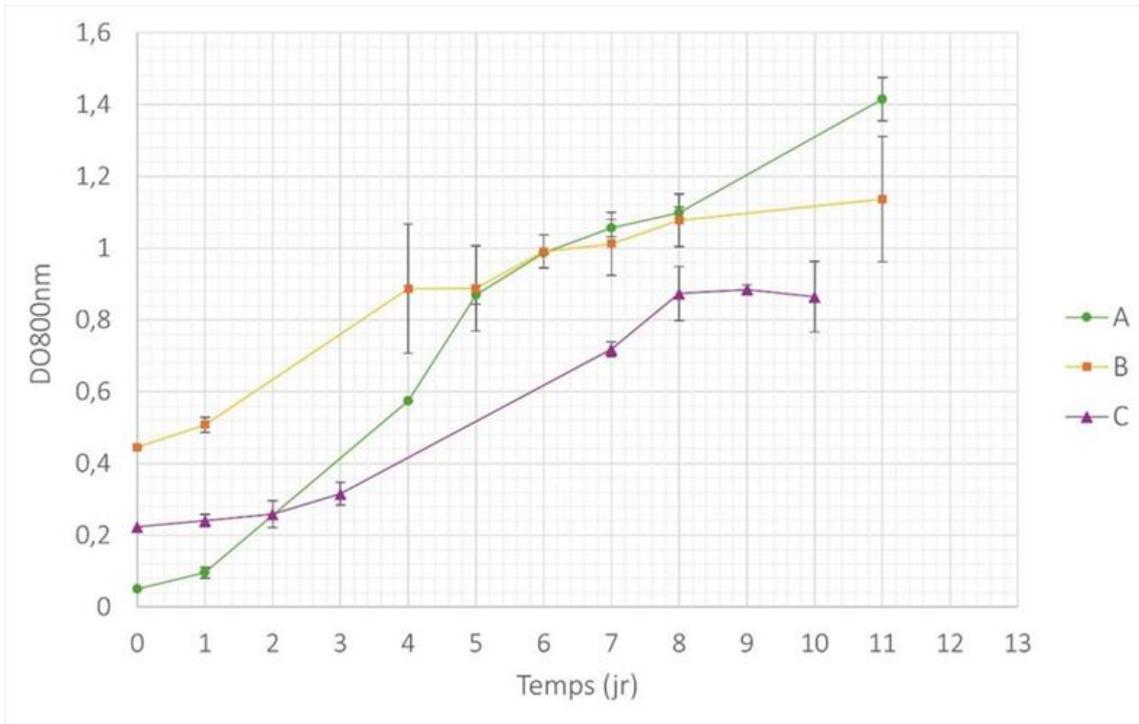


Figure 29 : Courbes de croissance de *Pleurastrum sp.* dans les conditions opératoires A, B et C et en fonction du temps. Les barres d'erreur indiquent les écarts types entre les triplicatas.

Sous les trois conditions d'intensité lumineuse, *Pleurastrum sp.* a épuisé l'intégralité du nitrate initialement présent dans le milieu, soit une consommation de 180 mg/L à la fin de la phase de croissance exponentielle. En revanche, sa consommation en phosphate a été linéaire pendant la phase de croissance exponentielle sous les conditions d'intensité lumineuse les plus faibles (A) et les plus élevées (C) avec une stabilisation de la concentration durant les derniers jours qui témoigne d'une phase stationnaire. Entre 32-41% de la concentration initiale de phosphate a été absorbée. Sous ces mêmes conditions, pour le sulfate, la microalgue a consommé 60 à 63% de sa concentration initiale au dernier jour de la culture. Toutefois, il semble que cette consommation aurait pu se poursuivre jusqu'à l'épuisement total du sulfate dans le milieu.

Par ailleurs, sous la condition B (49 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$), la consommation de phosphate a été plus faible en phase exponentielle, comparativement aux conditions A et C. Cette consommation s'est ensuite stabilisée autour de 20% de la concentration initiale dans le milieu à partir du 4^{ème} jour et ce jusqu'au dernier jour de la culture. Néanmoins, la microalgue a continué sa consommation de sulfate jusqu'au dernier jour de la croissance, environ 45% de sulfate initial a été consommé dans le milieu, qui semble restée stable du 7^{ème} jour jusqu'au dernier.

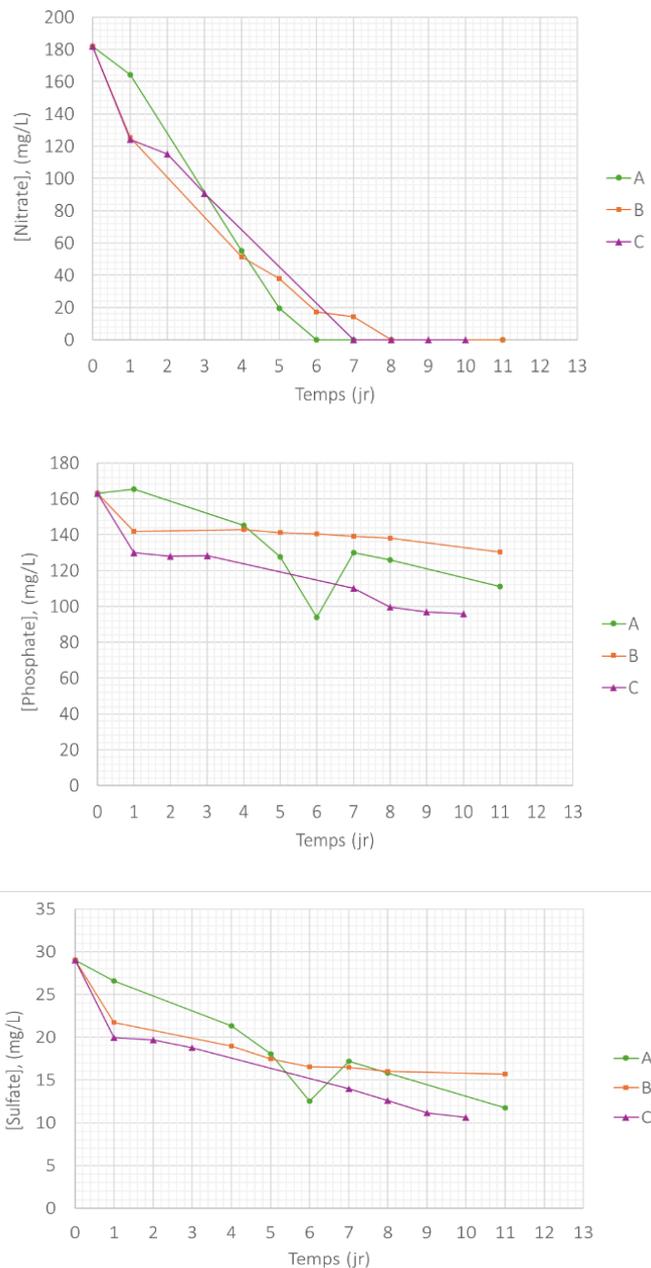


Figure 30 : Courbes de suivi des concentrations des nutriments lors de la croissance de *Pleurastrum sp.* en fonction des conditions opératoires A, B et C et en fonction du temps.

Il convient de souligner la différence majeure entre la condition A et les autres conditions B et C : la DO initiale et le volume du milieu de culture. Pour la condition A, ces valeurs étaient respectivement de 0,05 et 50 mL, alors que pour les conditions B et C, elles étaient de 0,2 et 100 mL, comme indiqué dans le Tableau 12. Cette différence pourrait être à l'origine du taux de croissance faible observé dans les conditions B et C. De plus, un accès réduit à la lumière pourrait également avoir contribué à une croissance plus lente. Cette observation est en accord avec l'étude de Xue, et al., (2021), qui ont montré que la densité cellulaire initiale peut influencer la croissance de *Chlorella sorokiniana*. Néanmoins, la condition C a permis d'obtenir un taux de croissance comparable à celui rapporté par Leya et al., (2009) à 10 °C et à une intensité lumineuse plus élevée de 120-220 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

4.1.3 Effet de la source de carbone : conditions C, D et E

Malgré une légère variation de la DO initiale dans les trois conditions C, D et E (comme indiqué dans le Tableau 12), une augmentation notable de la DO a été observée dans chaque condition après une phase de latence d'un jour (condition D et E) et de deux jours (condition C). Au cours de la phase de croissance exponentielle, que ce soit 1% de CO₂ (condition C), 2% de CO₂ (condition D) ou 2% de CO₂ avec bicarbonate (condition E), la DO a quadruplé, passant de 0,3 à environ 1,3.

La condition D a révélé le taux de croissance le plus élevé, estimé à 0,23 jour⁻¹ avec une productivité en matière sèche de 0,28 g/L/j. Elle est suivie de près par la condition E, qui a montré un taux de croissance de 0,18 jour⁻¹ avec une productivité en matière sèche de 0,24 g/L/j. Bien que la condition C ait affiché un taux de croissance identique à celui de la condition E, sa productivité en matière sèche était nettement inférieure, à 0,11 g/L/j.

Il a été de même pour les matières sèches intermédiaires et finales, où les conditions avec 2% de CO₂ et 2% de CO₂ avec bicarbonate (D et E) ont affiché des résultats similaires (0,6-0,7 g/L et 1,2-1,3 g/L respectivement), plus élevés qu'avec 1% de CO₂ (C) (0,3 g/L et 0,6 g/L respectivement). Ces résultats peuvent signifier que, bien que le taux de croissance puisse être similaire entre certaines conditions, la productivité en matière sèche peut varier considérablement. Par conséquent, Il apparaît que la souche a utilisé le CO₂ à 2% de manière plus efficace pour sa croissance et la production de biomasse.

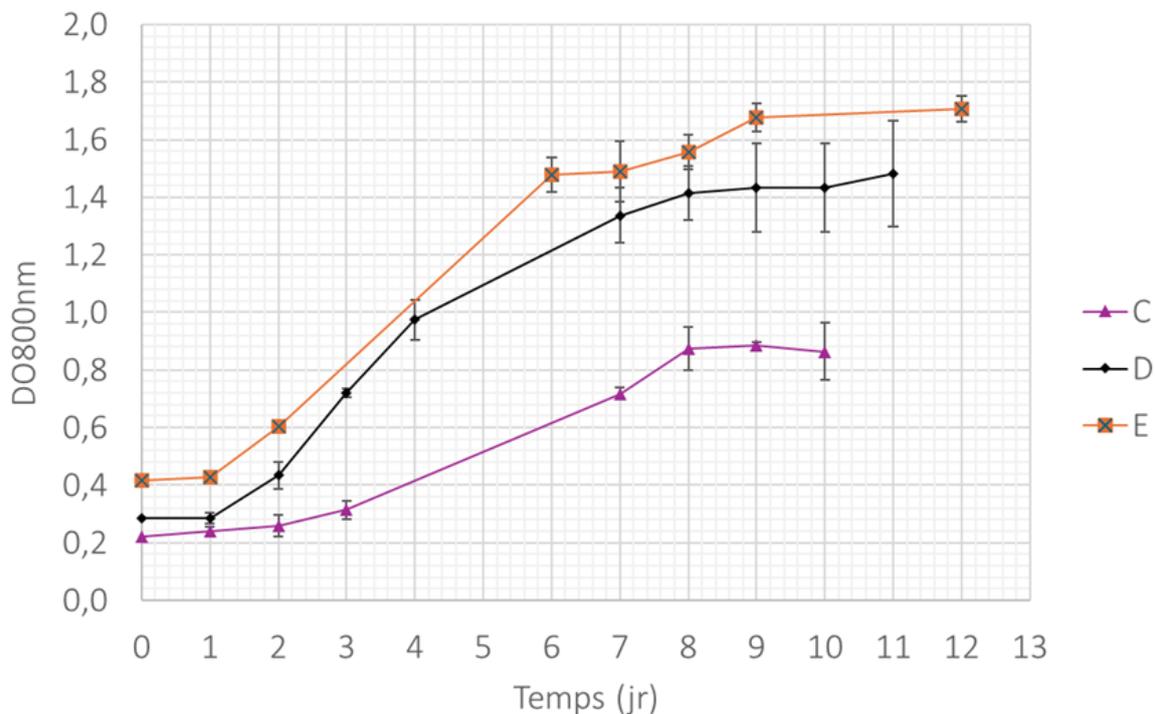


Figure 31 : Courbes de croissance de *Pleurastrum* sp. dans les conditions C, D et E en fonction du temps. Les barres d'erreur indiquent les écart-types entre les triplicatas

Quant à la consommation des nutriments, sous les trois conditions de CO_2 , *Pleurastrum sp.* a épuisé la totalité du nitrate initial présent dans le milieu au 6^{ème} ou 7^{ème} jour, marquant la fin de la phase de croissance exponentielle. Parallèlement, la microalgue a montré une consommation de phosphate très similaire en phase exponentielle, soit entre 35-42% de la concentration initiale dans le milieu au 7^{ème} jour. Cette consommation s'est ensuite stabilisée jusqu'au dernier jour de croissance. Cependant, la microalgue a poursuivi sa consommation de 60 à 70% de sulfate en phase exponentielle jusqu'au dernier jour de croissance. La consommation la plus élevée a été observée finalement sous la condition E (2% de CO_2 avec bicarbonate) avec 83%, suivie de la condition D (2% de CO_2) avec 71%, et enfin de la condition C (1% de CO_2) avec 63%.

Bien que le taux de croissance semble être relativement similaire dans les trois conditions, l'augmentation du taux de CO_2 à 2% a entraîné un effet positif, conduisant à des valeurs plus élevées en concentration finale de biomasse et de productivité. L'ajout de bicarbonate ne semble pas influencer significativement la croissance. Ces observations sont en accord avec ceux obtenus par Gonçalves et al., (2016), qui ont évalué l'effet de l'augmentation du CO_2 sur la production de biomasse chez une souche de *Chlorella vulgaris*. Ils ont trouvé que la concentration de 5% de CO_2 a été identifiée optimale, sur des variations de concentration allant de 3 à 10% de CO_2 .

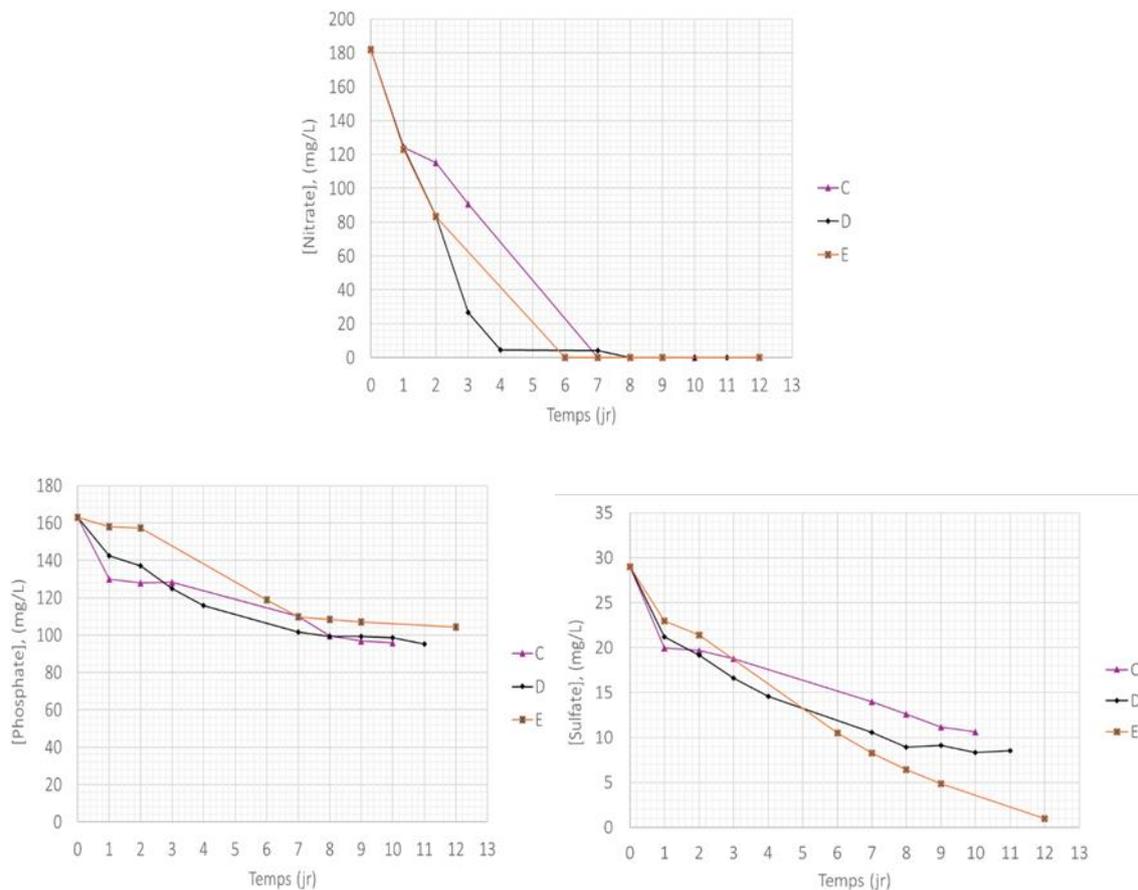


Figure 32 : Courbes de suivi des concentrations des nutriments lors de la croissance de *Pleurastrum sp.* en fonction des conditions opératoires C, D et E et en fonction du temps

4.2 *Sphaerocystis sp.*

Le Tableau 14 présente les taux de croissance estimés pour toutes les conditions entre le 1^{er} et le 8^{ème} jour, les matières sèches intermédiaires et finales et la productivité en fonction des conditions opératoires de A à F.

Tableau 14 : Suivi de la croissance de *Sphaerocystis sp.* en fonction des conditions opératoires.

Paramètres	Conditions					
	A	B	C	D	E	F
μ (j ⁻¹) estimé	0,45	0,07	0,38	0,19	0,11	0,18
MS intermédiaire (g/L)	non mesurée	0,4±0,02 (j4)	0,31±0,04 (j3)	0,43±0,18 (j4)	0,62±0,12 (j6)	0,38±0,06 (j3)
MS finale (g/L) (j11)	0,79±0,21	0,76±0,04	1,45±0,26 (j13)	1,12±0,01	0,91±0,19 (j12)	1,13±0,31 (j10)
Productivité en MS (g/L/j)	0,36	0,05	0,55	0,21	0,10	0,20

4.2.1 Effet de la température : conditions C et F

Sous les deux températures de 12°C (C) et 14°C (F), nous avons observé une progression linéaire de la DO tout au long de la culture. Il semble que la phase stationnaire n'ait pas été atteinte pendant la durée de l'expérience, mais il est difficile de confirmer en raison des barres d'erreur. Par conséquent, notre observation est basée sur l'intervalle du 1^{er} au 8^{ème} jour sur toutes les conditions.

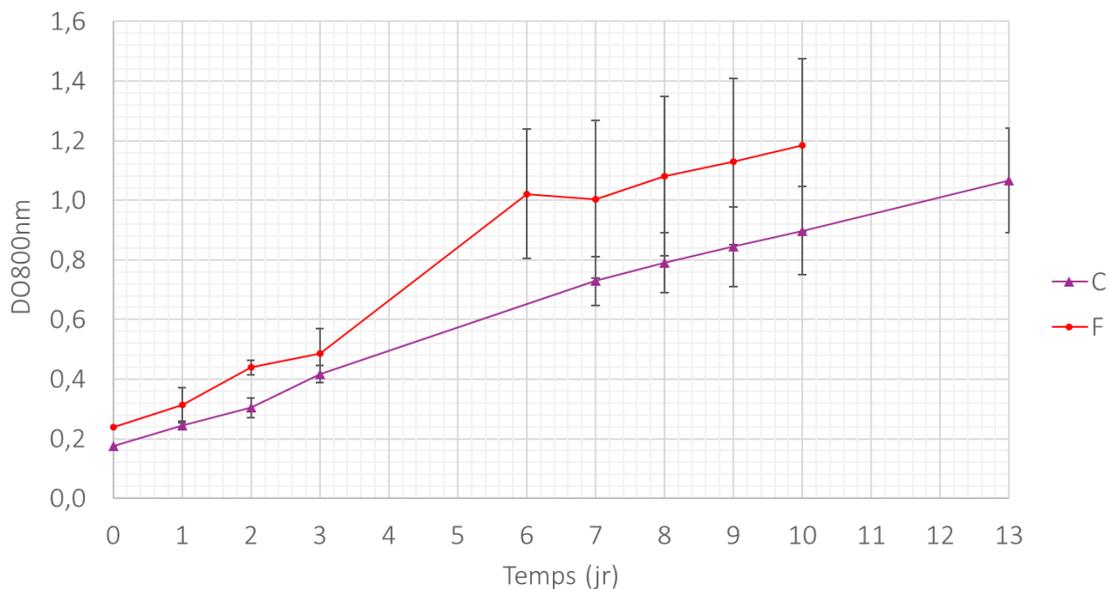


Figure 33 : Courbes de croissance de *Sphaerocystis sp.* en fonction des conditions opératoires. Les barres d'erreur indiquent les écarts-types entre les triplicatas.

En tenant compte de l'incertitude liée à la mesure, nous avons observé la DO a presque doublé, passant de 0,3 à 0,7 à 12°C et de 0,4 à 1,1 à 14°C. Cependant, *Sphaerocystis sp.* a affiché un taux de croissance et une productivité en matière sèche plus élevés à 12 °C, soit respectivement 0,38 jour⁻¹ et 0,55 g/L/j, par rapport à 0,18 jour⁻¹ et 0,20 g/L/j à 14°C. Néanmoins, les concentrations intermédiaires (0,31-0,38 g/L) et finales (1,13-1,45 g/L) de matière sèche aux deux températures se sont avérées relativement comparables.

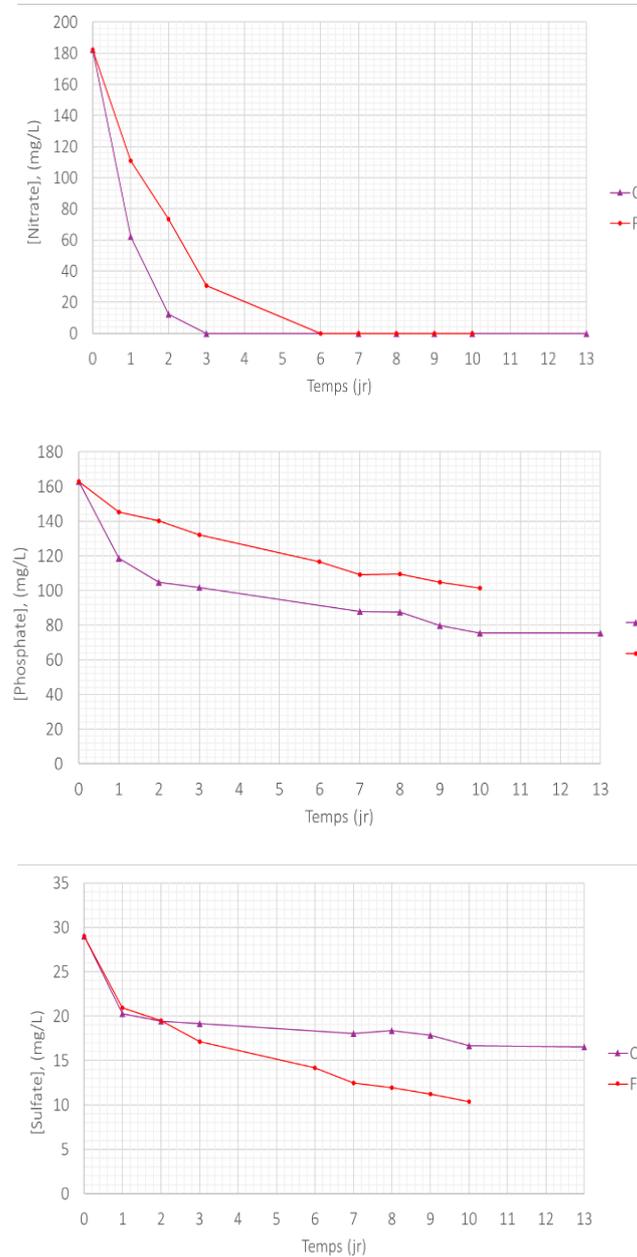


Figure 34 : Courbes de suivi des concentrations des nutriments lors de la croissance de *Sphaerocystis sp.* en fonction des conditions opératoires C et F en fonction du temps

L'intégralité du nitrate a été consommé aux deux températures de manière précoce pendant la culture. À 14 °C, l'épuisement est supposé se produire avant le 6ème jour, soit le 4ème ou au le 5ème jour, ce qui pourrait signifier la fin de la phase de croissance exponentielle. Cependant, à 12 °C, l'épuisement s'est produit le 3ème jour de la culture.

Sur la consommation des deux autres nutriments, nous avons noté une légère différence de comportement à 12°C et 14°C. Il est observé qu'avec l'épuisement précoce du nitrate à 12°C, la microalgue a utilisé davantage de phosphate qu'à 14°C, soit 54% par rapport à 38% de la concentration initiale de phosphate dans le milieu. En revanche, la microalgue a consommé moins de sulfate à 12°C qu'à 14°C (57% au lieu de 64%, respectivement).

Dans nos conditions expérimentales, il est clairement apparu que la température a un impact significatif sur la croissance de *Sphaerocystis sp.* Cette souche semble se développer plus efficacement à 12°C, qui est sa température initiale d'adaptation, qu'à 14°C, qui est sa température optimale. Lorsque nous comparons nos résultats à ceux de Leya et al., (2009), nous observons que notre taux de croissance estimé à 12°C de 0,38 jour⁻¹ est plus proche de leur taux de 0,5 jour⁻¹, même s'ils ont obtenu ce dernier à une température inférieure de 10°C, dans un milieu BBM avec une concentration de nitrate trois fois supérieure, et à une intensité lumineuse de 120-220 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Ces observations suggèrent que la température et la concentration de nitrate dans le milieu ont influencé significativement la croissance de *Sphaerocystis sp.* dans notre expérimentation. Cela nécessite toutefois d'être confirmée par des expériences supplémentaires.

4.2.2 Effet de l'intensité lumineuse : conditions A, B et C

Nous avons comparé les conditions A, B et C pour étudier l'effet de l'intensité lumineuse sur la croissance, en tenant compte des différences initiales de DO et de volume. Au cours de la culture, nous avons constaté une progression linéaire de la DO ce qui complique l'établissement objectif du début et de la fin d'une phase exponentielle. Aussi, il semble que la phase stationnaire n'a pas été atteinte pendant la durée de l'expérience, mais il est difficile de confirmer cette observation en raison de l'incertitude des mesures. Par conséquent, notre observation est basée sur l'intervalle du 1er au 8ème jour sur toutes les conditions.

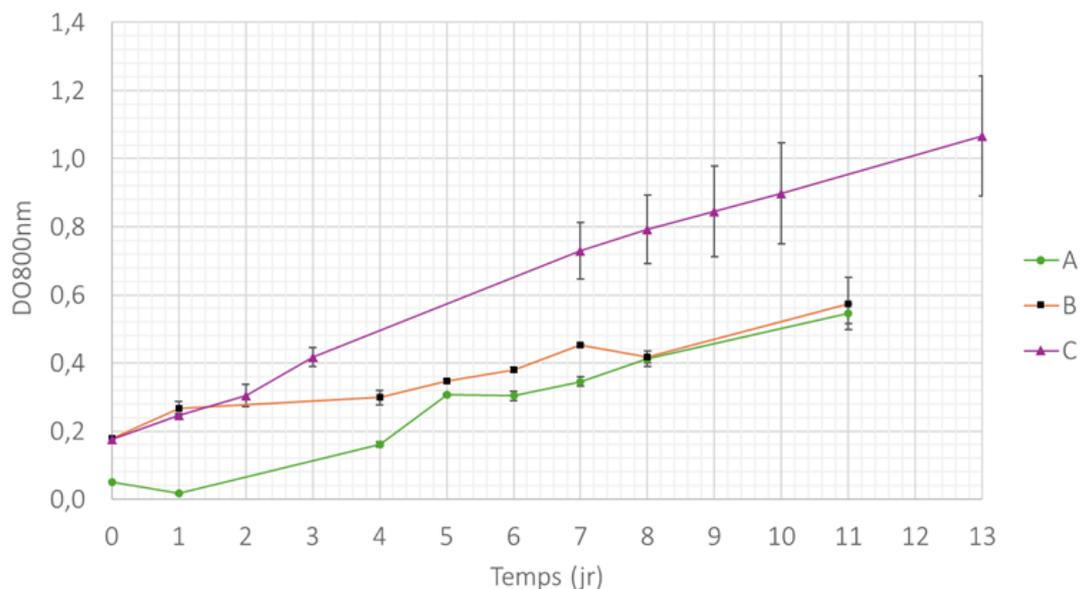


Figure 35 : Courbes de croissance de *Sphaerocystis sp.* en fonction des conditions opératoires. Les barres d'erreur indiquent les écart-types entre les triplicatas

À l'intensité lumineuse minimale (condition A), la DO a évolué de manière significative, passant de 0,05 à 0,3. À l'intensité la plus élevée (condition C), en tenant compte de l'incertitude liée à la mesure, nous observons que la DO a presque doublé, passant de 0,4 à 0,7. Quant à la condition B, il semble que la DO n'a pas beaucoup évolué, restant autour de 0,3 au 4^{ème} jour puis elle a continué à augmenter jusqu'à 0,6 au 11^{ème} jour qui marque la fin de la culture.

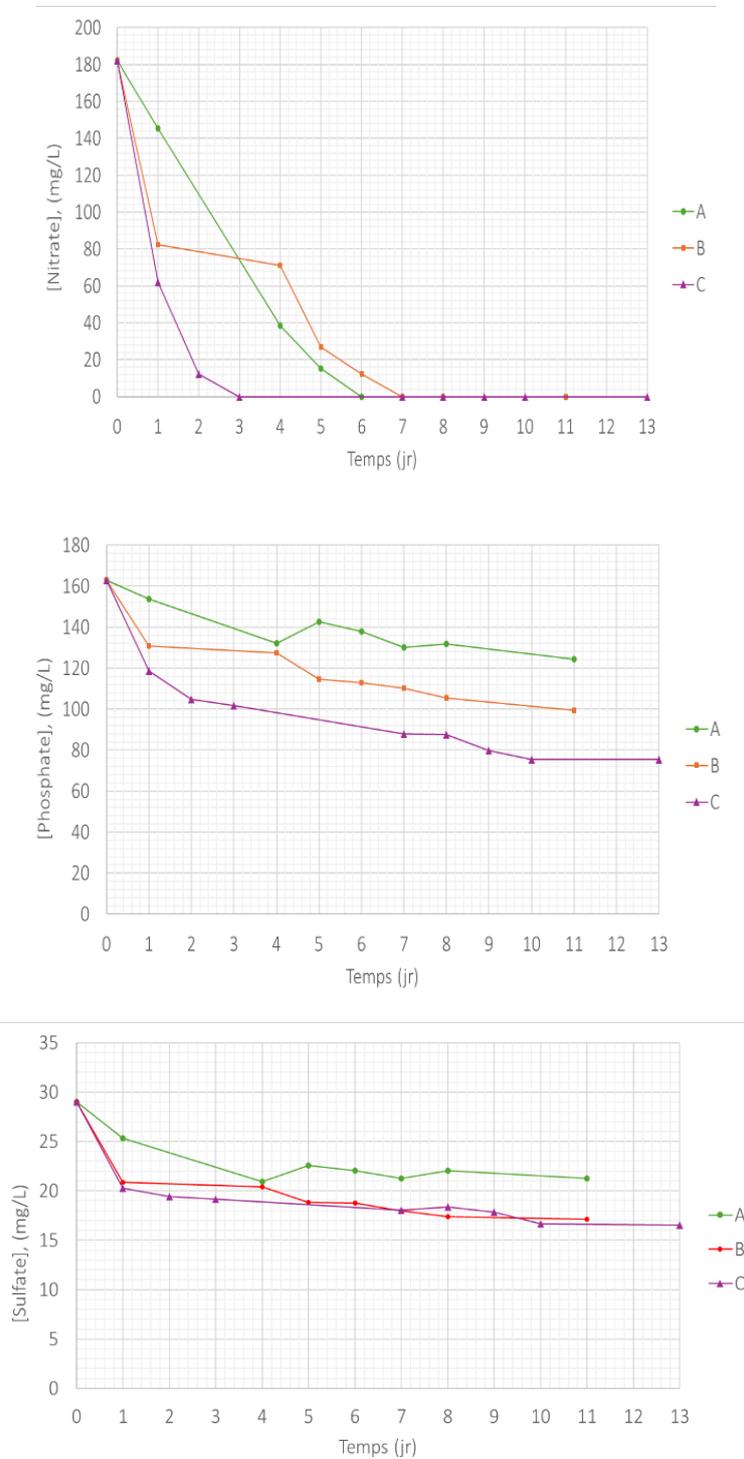


Figure 36 : Courbes de suivi des concentrations des nutriments lors de la croissance de *Sphaerocystis* sp. en fonction des conditions opératoires A, B et C en fonction du temps.

On peut constater que le comportement de la souche à l'intensité lumineuse maximale de 78 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (condition C) soit presque similaire à celui observé à l'intensité lumineuse minimale de 39 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (condition A). En effet, la souche affiche des taux de croissance 0,38-0,45 jour⁻¹ et des productivités en matière sèche 0,36-0,55 g/L/j. Toutefois, une différence notable est observée dans les matière sèches finales, avec 1,45 g/L pour la condition (C) contre 0,8 g/L pour la condition (A).

Par contre, à l'intensité lumineuse intermédiaire de 49 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (condition B), la souche a produit les plus faibles résultats, avec taux de croissance de 0,07 jour⁻¹ et une productivité en matière sèche de 0,05 g/L/j. Cette observation nous amène à supposer que, même si les taux de croissance et les productivités soient similaires, l'intensité lumineuse pourrait influencé la quantité finale de matière sèche produite. Cette hypothèse nécessite toutefois d'être confirmée par des expériences supplémentaires.

Au cours de la culture, *Sphaerocystis sp.* a assimilé la totalité du nitrate, respectivement au 6^{ème} et au 7^{ème} jour pour la condition A et B. Cependant, l'épuisement de ce nutriment a été plus précoce pour la condition C, où la microalgue a tout consommé dès le 3^{ème} jour de la culture et on pourrait supposer qu'avec plus de lumière, la microalgue est capable d'assimiler plus vite le N, et c'est cohérent avec une croissance plus forte (d'après la DO).

En parallèle, la consommation la plus élevée de phosphate initial dans le milieu a été enregistrée pour la condition C, avec 54%, suivie de 39% pour la condition B et seulement 24% pour la condition A. Quant à la consommation de sulfate, elle a été très similaire pour les conditions B et C, entre 41-42% du sulfate initiale dans le milieu, tandis que la consommation n'a été que de 27% pour la condition A. Cela confirme une activité métabolique plus élevée à l'intensité lumineuse la plus forte.

D'après cette expérimentation, nous avons constaté que l'augmentation de l'intensité lumineuse à sa valeur maximale semble favoriser la production de biomasse par la souche *Sphaerocystis sp.*. Cependant, il convient de souligner que le taux de croissance et la productivité restent pratiquement invariables, que l'intensité lumineuse soit minimale ou maximale. Cette observation est d'autant plus intéressante compte tenu des différences initiales de DO et de volume du milieu. De plus, nos taux de croissance, compris entre 0,38 et 0,45 jour⁻¹ sont relativement similaires à celui de 0,5 jour⁻¹ obtenu dans l'étude de Leya et al., (2009) sous une intensité lumineuse supérieure de 120-220 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ et à une température inférieure de 10 °C.

4.2.3 Effet de la source de carbone : conditions C, D et E

Dans notre comparaison, nous avons constaté une progression linéaire de la DO au cours de la culture, compliquant ainsi l'établissement objectif du début et de la fin d'une phase de croissance exponentielle. Aussi, il semble que la phase stationnaire n'a pas été atteinte pendant la durée de l'expérience, mais il est difficile de confirmer cette observation en raison de l'incertitude des mesures, notamment pour la condition C. Par conséquent, notre observation est basée sur l'intervalle du 1^{er} au 8^{ème} jour sur toutes les conditions.

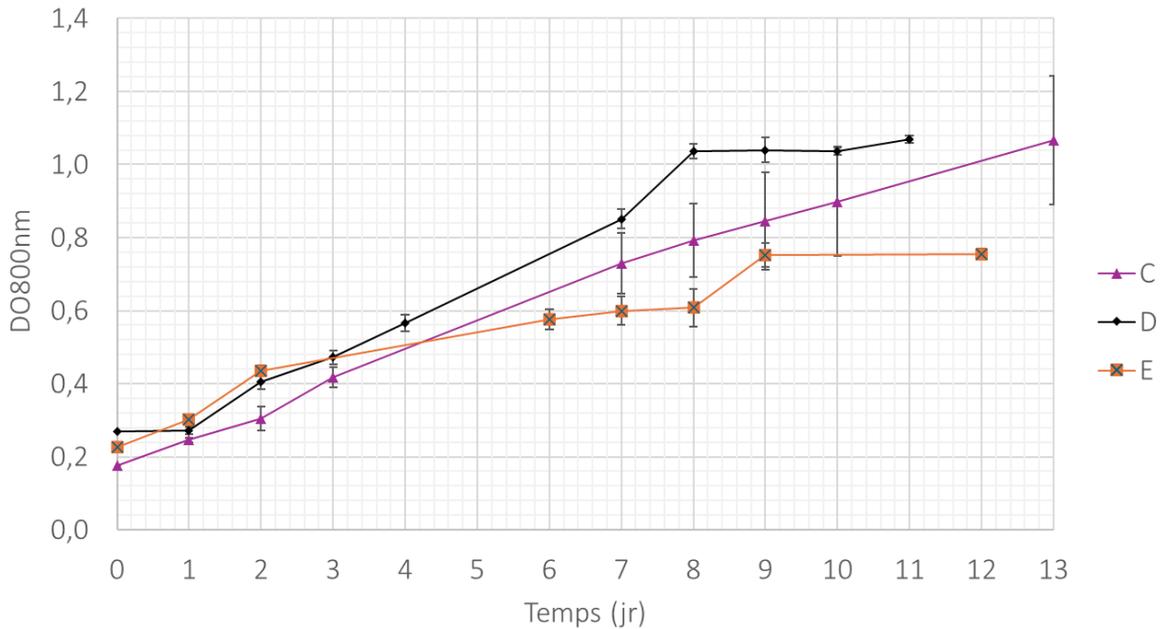


Figure 37 :. Courbes de croissance de *Sphaerocystis* sp. en fonction des conditions opératoires. Les barres d'erreur indiquent les écart-types entre les triplicatas

En prenant compte les barres d'erreur, nous constatons une augmentation significative de la DO similaire dans des conditions de 1% et 2% de CO₂, (condition C et D). Leur DO a presque quadruplé, passant de 0,3 à une plage de 0,8 à 1,1. Ces observations suggèrent que la présence de CO₂ pourrait avoir un impact significatif sur la DO.

Cependant, lorsque nous avons ajouté du bicarbonate à une atmosphère contenant 2% de CO₂ (condition E), l'augmentation de la DO a été plus modeste passant de 0,3 à 0,6. Cela nous conduit à suggérer que l'ajout de bicarbonate semble modérer l'effet du CO₂ sur la DO, peut-être en tamponnant les changements de pH dans le milieu.

Par ailleurs, la souche a produit le taux de croissance et la productivité en matière sèche les plus élevés, soit 0,38 jour⁻¹, 0,55 g/L/j, respectivement, dans une atmosphère de 1% de CO₂. En comparaisons, ces valeurs étaient de 0,19 jour⁻¹ et 0,21 g/L/j dans une atmosphère de 2% de CO₂. Dans une atmosphère de 2% de CO₂ avec du bicarbonate, la souche a produit les valeurs les plus basses, avec un taux de croissance de 0,11 jour⁻¹ et une productivité en matière sèche de 0,10 g/L/j.

Néanmoins, malgré ces différences, la matière sèche finale était relativement similaire dans les trois conditions, entre 0,9-1,45 g/L/j. Cela suggère que, bien que le taux de croissance et la productivité en matière sèche puissent varier, la quantité totale de matière sèche produite à la fin peut être assez similaire dans ces conditions. Cela est vrai même en tenant compte de l'incertitude des mesures. En d'autres termes, la souche semble s'adapter à son environnement pour maintenir une production constante de matière sèche, même si son taux de croissance et sa productivité peuvent varier.

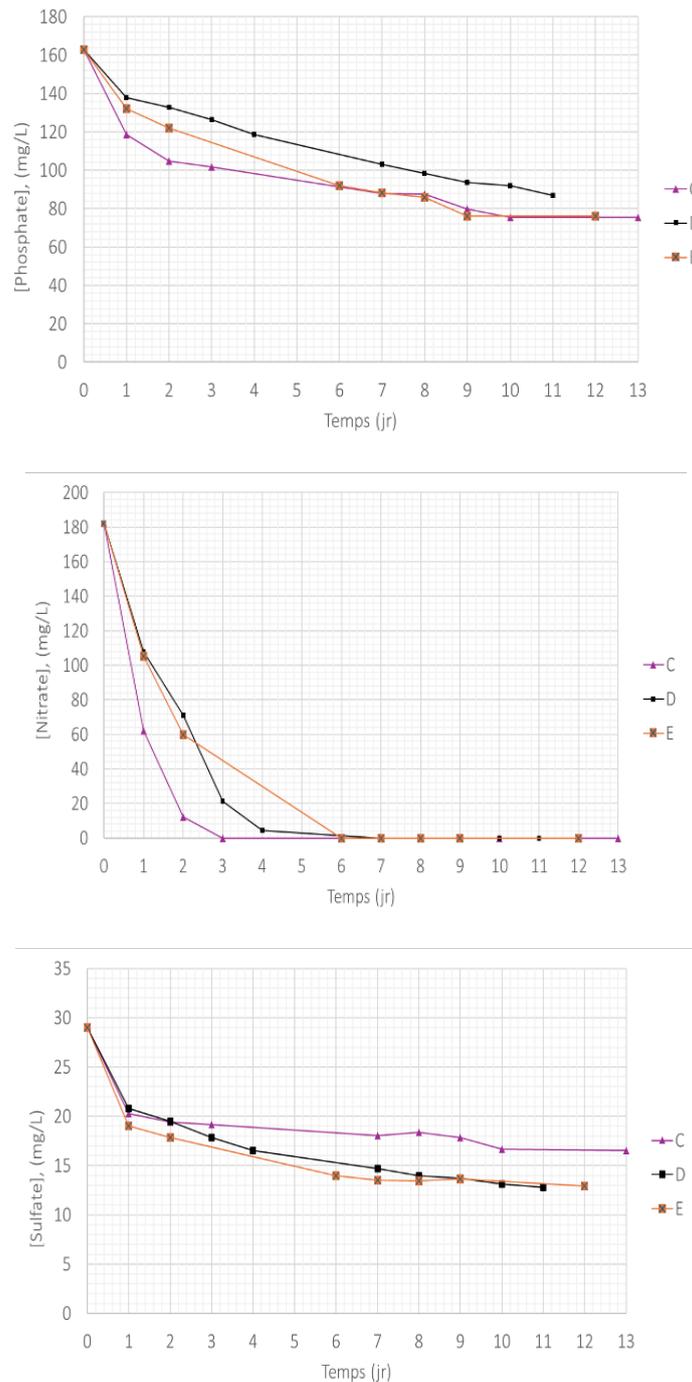


Figure 38 : Courbes de suivi des concentrations des nutriments lors de la croissance de *Sphaerocystis* sp. en fonction des conditions opératoires.

Au cours de son développement sous les trois conditions, *Sphaerocystis* sp. a montré un comportement similaire. Elle a épuisé tout le nitrate initialement présent dans le milieu. Cela s'est manifesté au 3^{ème} jour pour la condition C et au 4^{ème} jour pour la condition D. En ce qui concerne condition E, faute de mesure le 3^{ème} et 4^{ème} jour, nous supposons qu'elle n'est pas très éloignée de la condition D (épuisement le 4^{ème} jour), car l'évolution est similaire pendant les deux premiers jours.

Parallèlement, nous avons observé une diminution similaire de la concentration initiale du phosphate dans les trois conditions, atteignant la moitié de sa valeur, avec une stabilisation à partir du 10^{ème} jour. De la même manière, la consommation de sulfate est similaire entre les 3 modalités, correspondant à la moitié de sa concentration initiale dans le milieu. Cependant, sa concentration s'est stabilisée plus tôt, dès le 7^{ème} jour.

Suivant cette expérimentation, il semble que la souche se développe de manière optimale à une atmosphère contenant 1% de CO₂. L'élévation du taux de CO₂ à 2%, ainsi que l'ajout du bicarbonate, ont négativement influencé la croissance et la productivité de biomasse, même si sur les trois modalités, la matière sèche finale puisse paraître invariable.

5 Conclusion

Ce chapitre a détaillé la méthodologie mise en œuvre pour améliorer la croissance et la production de biomasse des deux souches psychrophiles, *Pleurastrum sp.* et *Sphaerocystis sp.*, au cours de la phase verte de culture. Au départ, l'effort a été axé sur l'adaptation de ces souches aux conditions opératoires choisies. Par la suite, une sélection rigoureuse des paramètres jugés cruciaux pour la transition de la phase verte vers la phase rouge, a été réalisée dans le cadre de notre étude exploratoire approfondie.

Cette démarche nous a permis non seulement d'élargir notre compréhension, mais aussi d'améliorer la culture de ces souches psychrophiles à une échelle de 100 mL en fiole Erlenmeyer. Les premières expériences de l'adaptation ont offert une occasion d'observer le comportement et le développement des souches sélectionnées pendant la phase de croissance. Les données recueillies ont ensuite servi de fondement pour la conception des expériences ultérieures plus détaillées dans le cadre de l'étude paramétrique de la phase rouge.

Enfin, l'effet de la variation de plusieurs paramètres, la température, l'intensité lumineuse et la source de carbone, a été minutieusement étudié afin d'identifier les conditions opératoires les plus favorables pour produire une quantité suffisante de biomasse. Ces résultats nous permettent d'envisager la production de biomasse à l'échelle d'un photo-bioréacteur de 6 litres et la phase suivante de notre étude, axée sur la culture en phase rouge.

Chapitre 3 : Résultats et discussions

Section 2 : Étude de la culture des souches psychrophiles en phase rouge

1 Introduction

La production d'astaxanthine chez les microalgues a été principalement étudiée chez *H.pluvialis* à petite et à grande échelle. Cependant, il existe peu d'études sur les microalgues psychrophiles sélectionnées.

L'étude menée par Leya et al.,(2009), a permis de commencer à caractériser les souches *Sphaerocystis sp.* et *Pleurastrum sp.* en culture, en phases verte et rouge. Toutefois, ces deux souches n'ont pas été étudiées dans la littérature à l'échelle du photo-bioréacteur.

L'objectif est donc de déterminer les conditions préférentielles de croissance et de stress de ces microalgues en culture, d'abord à échelle des fioles Erlenmeyers, puis en photo-bioréacteur de 6 litres. Cela permettra de recueillir des données essentielles sur la production de biomasse microalgale rouge et leur teneur en caroténoïdes et lipides, en vue de mettre au point des méthodes de prétraitement et d'extraction éco-efficente.

2 Méthodologie générale

Afin d'étudier les conditions favorisant la transition vers la phase rouge, une montée en échelle en phase verte dans des photo-bioréacteurs de 6 litres a tout d'abord été réalisée pour produire assez de biomasse et réaliser de nombreux tests de stress en fiole Erlenmeyer.

Les cultures en phase verte ont été réalisées en appliquant les conditions préférentielles spécifiques à chaque souche, déterminées dans la section I.

Enfin, lorsque les meilleures conditions de stress ont été identifiées en fiole Erlenmeyer, une montée en échelle en phase rouge a été réalisée à l'échelle du photo-bioréacteur de 6 litres.

2.1 Milieux de culture

Les différents milieux de culture utilisés sont BBM, B3N, BNH4 et TAP pour la croissance en phase verte des souches psychrophiles. Leur composition, avec le mix de vitamines, est détaillée dans le chapitre Matériels et méthodes. Du bicarbonate de sodium et des vitamines sont ajoutés ponctuellement aux PBRs quand la croissance cellulaire et la consommation de nutriments ralentissent.

Pour l'induction de la phase rouge, des milieux dérivés du BBM ont été utilisés. Leur composition est détaillée dans le **Tableau 15**.

Tableau 15 : Composition des milieux de culture dérivés du BBM pour l'induction du stress lors de la phase rouge. (A) : Ajouté, (NA) : Non-Ajouté, (*) : solution de NaCl à 6 g/L. (N) : Nitrate, (P) : Phosphate, (S) : Sel.

Milieux		Composition		
		NaNO ₃ (25 g/L)	K ₂ HPO ₄ (7,5 g/L) KH ₂ PO ₄ (17,5 g/L)	NaCl (2,5 g/L)
A : BBM	Témoin	A	A	A
B : BBM-N	Carence en N	NA	A	A
C : BBM-P	Carence en P	A	NA	A
D : BBM-N-P	Carence en N et P	NA	NA	A
E : BBM+S	Stress salin	A	A	A*
F : BBM+S-N	Stress salin et carence en N	NA	A	A*
G : BBM+S-P	Stress salin et carence en P	A	NA	A*
H : BBM+S-N-P	Stress salin et carence en N et P	NA	NA	A*

2.2 Paramètres de culture en photo-incubateur

Tout d'abord, des précultures, en phase verte, de 250 mL à 1 L, sont préparées et placées dans le photo-incubateur (Infors HT Minitron), en fixant les paramètres suivants : température à 12 °C, taux de CO₂ dans l'air à 1%, et agitation à 120 rpm.

Sur 24 heures, la phase de jour durait 20 heures avec une faible intensité lumineuse entre 45 et 60 µmol/m²/s, et la phase de nuit durait 4 heures. Pour l'induction du stress lors de la phase rouge, l'intensité lumineuse est augmentée entre 225 et 325 µmol/m²/s suivant les expériences.

2.3 Paramètres de culture en photo-bioréacteur

Les photo-bioréacteurs (PBRs) utilisés sont de type colonne à bulles en verre à double enveloppe avec une capacité de 6 L (voir **Figure 39**). Le PBR à double enveloppe est raccordé à un cryostat qui assure le maintien de la température à 14 °C. Le pH de la culture est mesuré par une sonde in-Lab Mettler Toledo, dont le suivi et l'acquisition de données se font en utilisant un système consort C3040 et le logiciel Dis. Au sein du réacteur, l'aération et l'agitation sont assurées par un flux d'air et de CO₂ contrôlés par des débitmètres Bronkhost et le logiciel Bronkhost Flow Suite associé. Le rôle de la pierre poreuse est la diffusion de l'air sous forme de bulles dans le réacteur.

Le taux de CO₂ dans l'air varie de 1% à 2% (v/v) afin d'assurer un pH approprié aux cultures et une source de carbone. Le débit d'air est fixé à 0,5 NL/min ou à 1 NL/min en fonction de la formation de biofilms sur la pierre poreuse. La lumière fournie par les deux néons LED est d'une intensité de 120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ avec une photopériode de 20 heures jour et de 4 heures nuit.

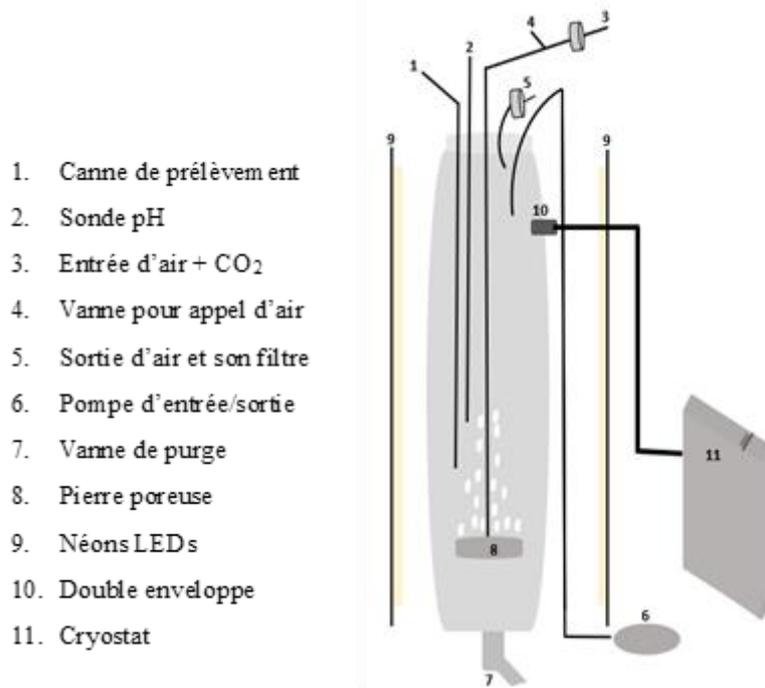


Figure 39 : Schéma du photo-bioréacteur de type colonne à bulles à double enveloppe utilisé. Pour la phase rouge, des panneaux LED supplémentaires sont installés autour du PBR pour augmenter l'intensité lumineuse. Ils ajoutent 150 à 250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ d'intensité lumineuse en plus des néons existants en phase verte.

2.4 *Suivi des cultures*

Les suivis de culture sont assurés par des mesures régulières de DO, de MS, du pH et par des observations cellulaires. Les concentrations en nutriments dans le milieu sont aussi régulièrement analysées par chromatographie ionique pour suivre leur évolution au cours du temps et ainsi déterminer le moment pour réalimenter les PBR en nitrate, sulfate et phosphate. Les vitesses de consommation ont été approchées par régression linéaire.

2.5 *Extraction et quantification des pigments et des lipides*

Pour la quantification des pigments et des lipides, la méthode d'extraction assistée par broyage à billes est appliquée. Elle est réalisée dans de l'éthanol 95%, en utilisant le broyeur modèle MP Biomedicals FastPrep-24 TM 5G. Les détails spécifiques de cette méthode, ainsi que les méthodes de quantification par spectrophotométrie et HPLC-UV, par GC-MS, sont décrits en détails dans le chapitre **Matériels et méthodes**.

3 Expériences sur *Pleurastrum sp.*

3.1 Étude préliminaire de la phase rouge en fiole Erlenmeyer

3.1.1 Méthode de production de biomasse en PBR de 6 L

Une culture en phase verte de *Pleurastrum sp.* a d'abord été réalisée en PBR en mode fed batch dans du B3N à 14 °C, pendant quatre mois. L'objectif était de suivre sa croissance dans un volume de 5 L et de fournir la biomasse nécessaire pour lancer les expériences en phase rouge. Pour favoriser la croissance, le PBR a été réalimenté régulièrement avant d'arriver en limitation nutritionnelle (nitrate < 100 mg/L, phosphate < 50 mg/L, ou sulfate < 10 mg/L). 100 mL de bicarbonate de sodium (28 g/L) ont été également ajoutés ponctuellement afin de réguler le pH et maintenir une source de carbone suffisante.

Après avoir atteint une quantité suffisante de biomasse au 96^{ème} jour dans le PBR, la récolte de biomasse a été réalisée afin de procéder à des expériences de stress en fiole Erlenmeyer.

La culture était visiblement composée de 3 différentes formes, à savoir en biofilm sur les parois du PBR, en suspension avec des cellules isolées et en floccs (agrégats). Étant trop gros pour être récupérés via la canne de prélèvement, les floccs et une partie des cellules en suspension ont été récoltés en arrêtant l'aération, pour les laisser sédimenter, puis en ouvrant la vanne de purge du PBR. De cette manière, un litre de culture de *Pleurastrum sp.* a été récupéré dans une bouteille et la phase verte en PBR s'est poursuivie avec un volume de 4 L.

3.1.2 Résultats de production de biomasse en PBR de 6 L

3.1.2.1 Suivi de la croissance

Le suivi de la croissance de *Pleurastrum sp.* en PBR en mode fed batch pendant la phase verte est présenté dans la **Figure 40**.

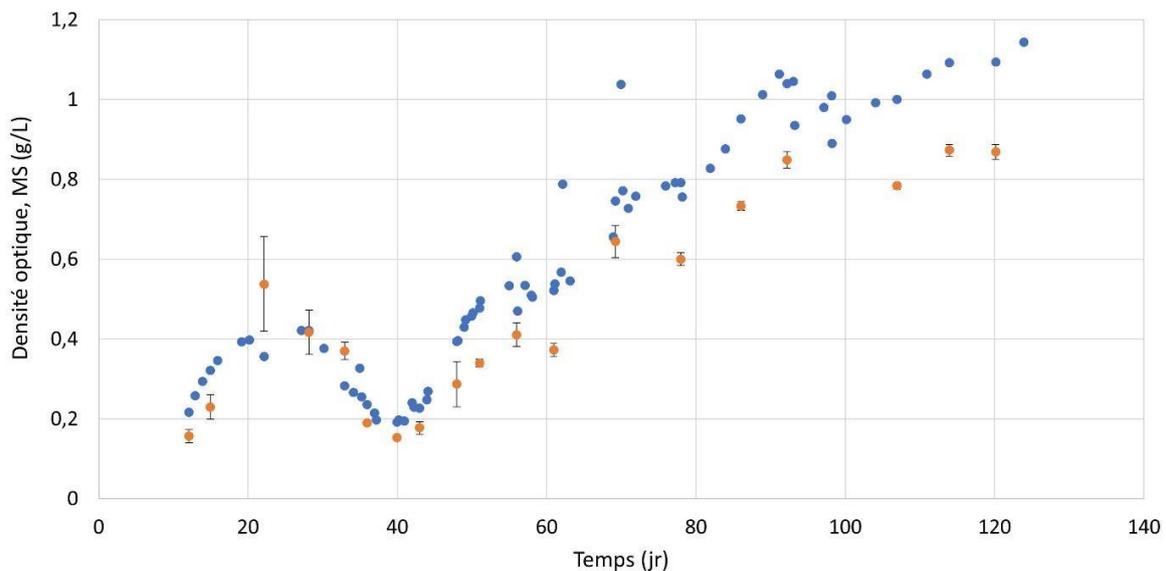


Figure 40 : Suivi de croissance de *Pleurastrum sp.* en PBR pendant 4 mois en mode Fed Batch par la DO (•) et la MS (◐). Les barres d'erreur indiquent les écart-types des triplicates

Contrairement à son développement en fiole de moins d'un litre, la culture peut prendre visiblement 3 différentes formes, à savoir en biofilm sur les parois du PBR, en suspension avec des cellules isolées et en flocs (agrégats) de différentes tailles (**Figure 41**).

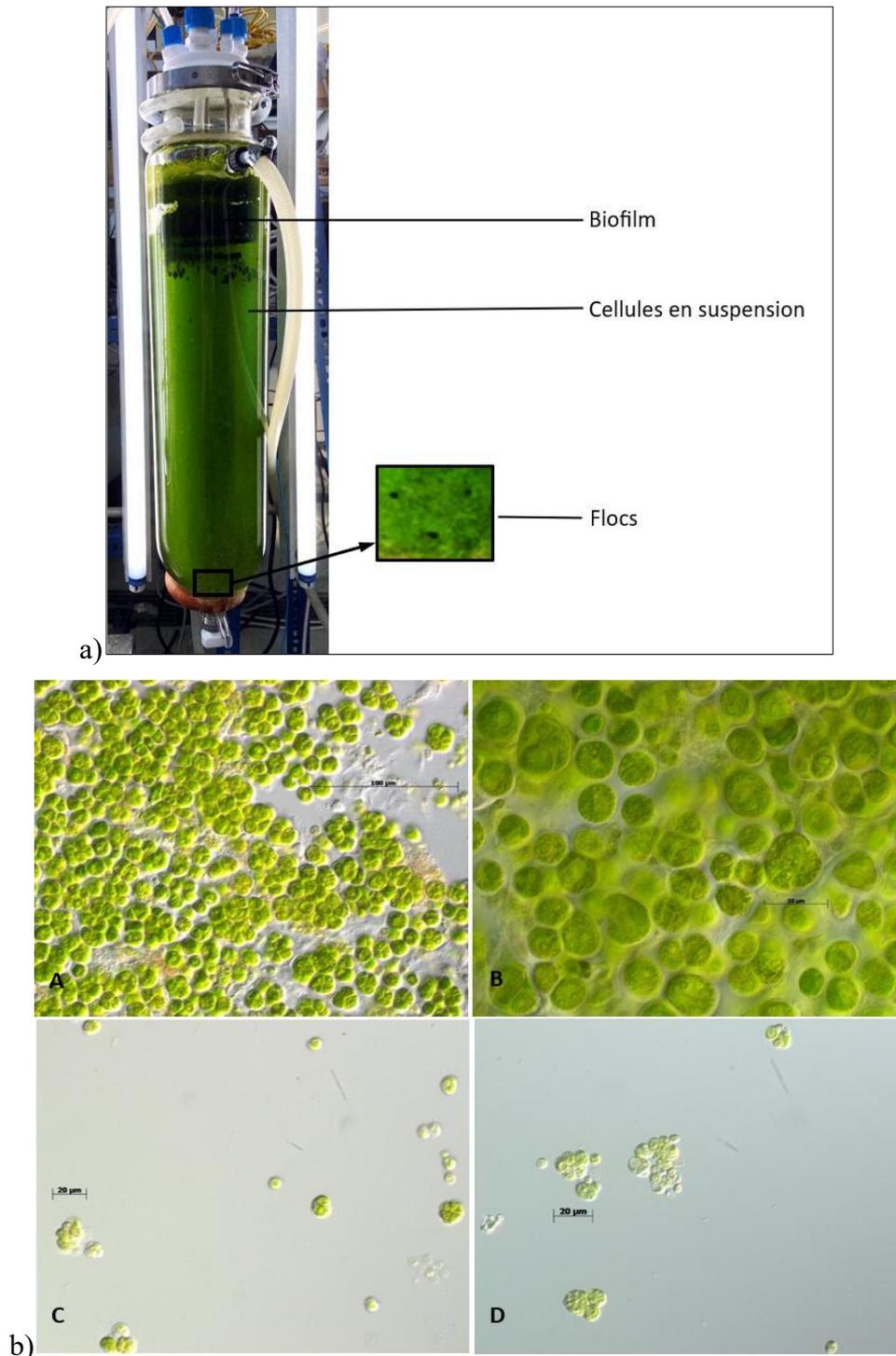


Figure 41 : a) *Pleurastrum* sp. en PBR sous trois formes, en biofilm, en suspensions et en flocs. b) Observations microscopiques (x400) de la culture de *Pleurastrum* sp. en PBR. A) Un floc de cellules observé après 71 jours de culture, B) Un floc de cellules observé après 91 jours au grossissement X1000, C) Cellules en suspension observées après 72 jours, et D) Cellules en suspension observées après 104 jours.

Le suivi de la culture par la mesure des DO et de MS représente uniquement la croissance des cellules en suspension et des floccs les moins importants. En effet, les mesures étant effectuées à partir de prélèvement via une canne plongeante dans le BPR, les biofilms sur les parois ne sont pas comptabilisés et les plus gros floccs ne pouvaient pas être prélevés. Malgré cela, les mesures ont permis de montrer la capacité de croissance de cette souche à l'échelle de 5 L en PBR, avec une densité optique à 800 nm pouvant dépasser 1 en phototrophie, avec un taux de croissance exponentiel de $0,12 \text{ jour}^{-1}$ après la première alimentation et une concentration en matières sèches qui continue à augmenter jusqu'à $1,2 \text{ g/L}$ en fin du 4^{ème} mois.

Dans le PBR, *Pleurastrum sp.* formait des floccs constitués de caenoblastes, observées dans l'image B dans la **Figure 41**. Ces cellules, plus grandes et plus vertes que les cellules en suspension, ont un diamètre variant de 10 à 20 μm . Elles sont idéales pour suivre la croissance en phase verte et le stress en phase rouge. Les petites cellules en suspension, en revanche, ne peuvent pas stocker de caroténoïdes secondaires en raison de leur espace cytoplasmique réduit. Cela a soulevé une question importante concernant la possibilité de provoquer du stress sur les floccs en présence de cellules en suspension.

3.1.2.2 Suivi de la consommation des nutriments

En ce qui concerne le suivi des nutriments dans le PBR, nos résultats ont révélé une décélération progressive de la consommation de nitrate au fil des réalimentations. Cependant, une accélération notable a été observée après l'ajout de vitamines, de microéléments et de bicarbonate de sodium, une source supplémentaire de carbone inorganique. Cette augmentation de la vitesse de consommation coïncide avec une remontée de la DO, indiquant que la souche a besoin de ces éléments nutritifs. Ces observations mettent en évidence le rôle crucial de ces composants dans la consommation de nitrate par la souche étudiée et suggère qu'ils pourraient avoir un impact significatif sur la santé et le métabolisme de la souche.

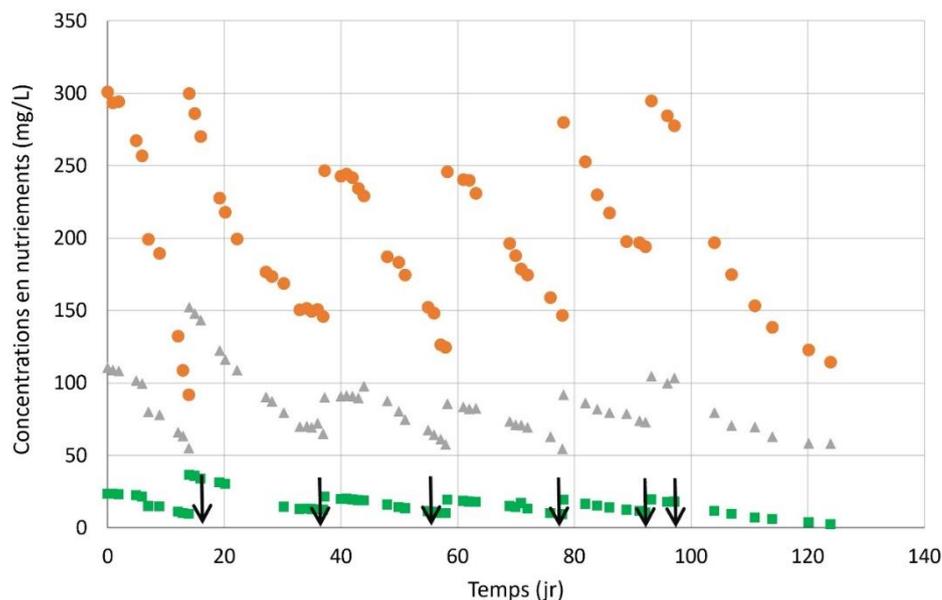


Figure 42 : Concentration en nitrate (●), phosphate (▲) et sulfate (■) dans le PBR en fed-batch avec *Pleurastrum sp.*. Des réalimentations régulières sont montrées en flèches noires.

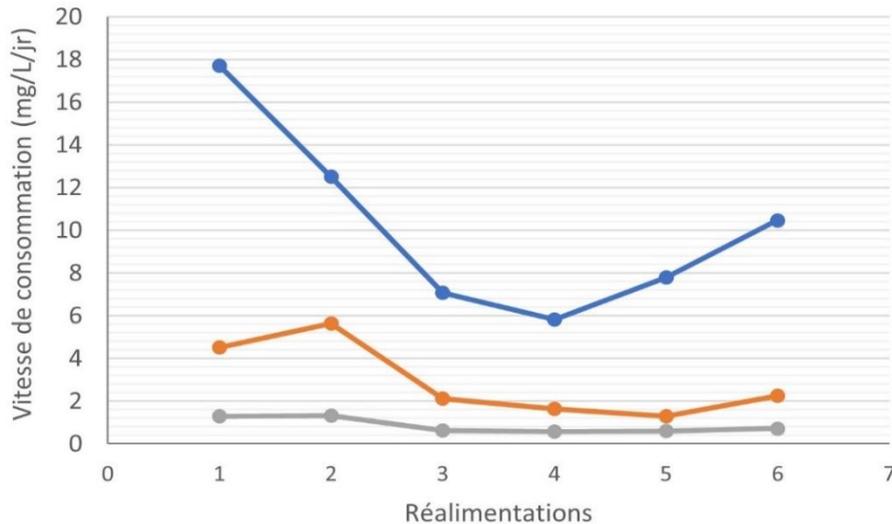


Figure 43 : Vitesses de consommation en nitrate (●), en phosphate (●) et en sulfate (●), calculées entre chaque réalimentation au cours de la culture dans le PBR de *Pleurastrum sp.*

3.1.2.3 Quantification des pigments

La quantification des chlorophylles a et b et des caroténoïdes totaux à la fin de la phase verte, qui représente l'état initial de la phase rouge est représentée dans la **Figure 44**. La microalgue *Pleurastrum sp.* synthétise des quantités significatives de chlorophylle a et b, ainsi que de caroténoïdes totaux, lors de sa phase de croissance verte. Cependant, cette quantification n'a pas révélé de différences importantes entre les cultures en floccs seuls et celles contenant les floccs et les cellules en suspension.

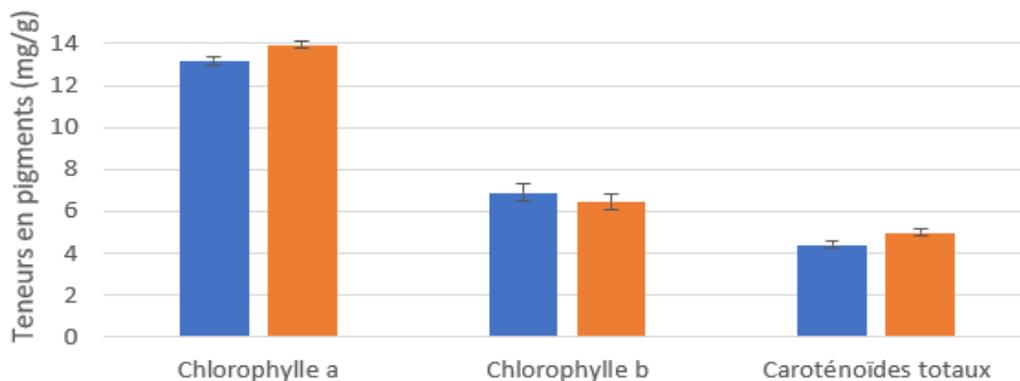


Figure 44 : Teneurs en pigments des cultures vertes de *Pleurastrum sp.* récoltées du PBR dans le milieu B3N, sur uniquement les floccs (●) et sur la culture homogène de floccs et de cellules en suspension (●). Ces cultures représentent l'état initial du test de stress avec cette souche. Les barres d'erreur indiquent les écarts-types entre les triplicatas.

Pour les deux cultures étudiées de *Pleurastrum sp.*, une synthèse notable de chlorophylle a et b est observée, avec des valeurs respectives de 13 à 14 mg/g MS et de 6 à 7 mg/g MS. Ces pigments, qui jouent un rôle crucial dans la photosynthèse pendant la phase de croissance, sont produits en quantités qui correspondent aux valeurs rapportées par Leya et al. (2009), soit 12,8 mg/g MS pour la chlorophylle a et 6,7 mg/g MS pour la chlorophylle b.

En ce qui concerne les caroténoïdes totaux, les deux cultures ont affiché une concentration de 4 à 5 mg/g MS, comparable à la somme des pigments quantifiés par le même auteur en phase verte, soit 4,5 mg/g MS. Selon l'auteur, cette concentration élevée est principalement due à la présence de caroténoïdes primaires tels que la lutéine, la néoxanthine et une petite quantité de bêta-carotène, ainsi qu'à la présence de xanthophylles comme la violaxanthine, une petite quantité d'anthéranthine, de zéaxanthine et d'alpha-tocophérol.

Suite à cette première étude, nous avons observé que la microalgue *Pleurastrum sp.* présente des teneurs en pigments similaires, qu'elle soit cultivée sous forme de floes seuls ou en combinaison avec des cellules en suspension. Par ailleurs, il est apparu essentiel d'étudier la capacité de production des caroténoïdes par les formes cellulaires de la microalgue lors d'un stress en phase rouge.

3.1.3 Méthodologie de l'étude préliminaire en phase rouge

La combinaison de trois facteurs : haute intensité lumineuse, carence en nutriments et salinité élevée, a été appliquée pendant 24 jours afin d'étudier la phase rouge sur les deux formes cellulaires de *Pleurastrum sp.* La méthodologie est schématisée dans la **Figure 45**. Les six conditions ont été mises en œuvre en fioles Erlenmeyers de 150 mL avec un volume initial de 50 mL en triplicatas.

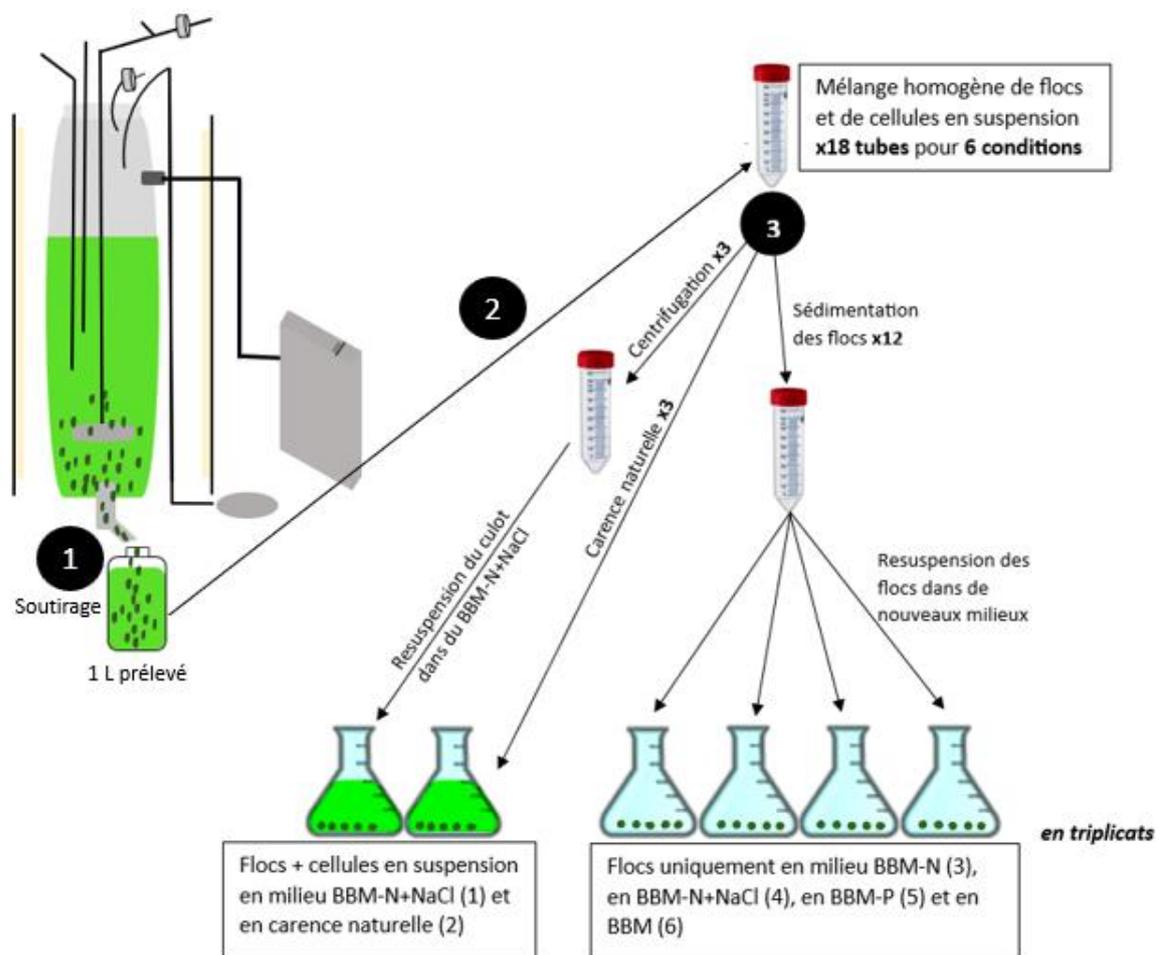


Figure 45 : Schéma de la méthode d'étude préliminaire de la phase rouge avec *Pleurastrum sp.*

Quatre conditions de stress ont été étudiées avec les flocs seuls, en les transférant avec une pipette dans quatre milieux différents : BBM (témoin), BBM-N, BBM-N+NaCl, et BBM-P. Une quantité similaire de flocs a été introduite dans chaque fiole, de manière visuelle. Deux autres conditions de stress ont été étudiées avec un mélange de flocs et de cellules isolées en suspension directement prélevé au sein du PBR : une carence naturelle et un stress en milieu BBM-N+NaCl. La carence naturelle consiste simplement à transférer le prélèvement dans des fioles Erlenmeyers et suivre l'évolution de la culture. En revanche, pour la condition BBM-N+NaCl, le prélèvement issu du PBR est centrifugé, puis le culot est inoculé dans le nouveau milieu en fiole Erlenmeyer.

3.1.4 Résultats de l'étude préliminaire en phase rouge

3.1.4.1 Observation visuelle et microscopique

Indépendamment du type de stress appliqué et de la forme cellulaire utilisée, nous avons observé que la synthèse des caroténoïdes de stress était induite dans toutes les conditions de culture. Cette observation a été confirmée visuellement dans les cultures en fiole, où la pigmentation a changé du vert initial à l'orange à la fin de la culture. Cette transformation indique que les conditions de stress ont déclenché la production et l'accumulation des caroténoïdes par les cellules de *Pleurastrum sp.* Cette observation a été également confirmée par l'examen au microscope optique des cellules qui paraissent sous forme de kystes avec un cytoplasme orange, de 10 et 20 μm de diamètre (**Figure 46** et **Figure 47**).

La limitation en nitrate a eu un impact direct sur l'induction de la synthèse des caroténoïdes de stress. Les flocs, exposés à un stress dans le milieu BBM-N (condition C) ainsi que dans le milieu BBM-N+NaCl (condition D) ont manifesté une pigmentation rouge-orange prononcée. Ces deux cultures sont perçues comme contenant une quantité plus élevée de caroténoïdes secondaires en comparaison avec les autres cultures. De plus, l'effet de la limitation en nitrate ne semble pas être affecté par la combinaison avec le stress salin qui exerce un stress oxydatif.



Figure 46 : Photographies des cultures de *Pleurastrum sp.* au 1er et 24ème jours de stress. **A** : flocs et cellules en suspension dans du BBM-N+NaCl, **B** : flocs et cellules en suspension en carence naturelle, **C** : flocs dans du BBM-N, **D** : flocs dans du BBM-N+NaCl, **E** : flocs dans du BBM-P, **F** : flocs dans du BBM (témoin).

Cependant, le mélange (flocs et cellules en suspension) soumis à une carence naturelle n'avait pas atteint le stade de kystes oranges (condition B) en 24 jours. Cela pourrait s'expliquer par la densité cellulaire initiale importante qui limite l'accès à la lumière. Les cellules pourraient donc avoir besoin de plus de temps pour se transformer en kystes oranges, comme observé dans les autres conditions. D'autre part, bien que la densité cellulaire initiale fût faible par rapport au mélange, lorsque les flocs ont été soumis à une limitation de phosphate (condition E), les kystes étaient à la fois verts et oranges. Cela pourrait signifier que la limitation en phosphate n'a pas un impact aussi important que celle du nitrate sur la transition cellulaire.

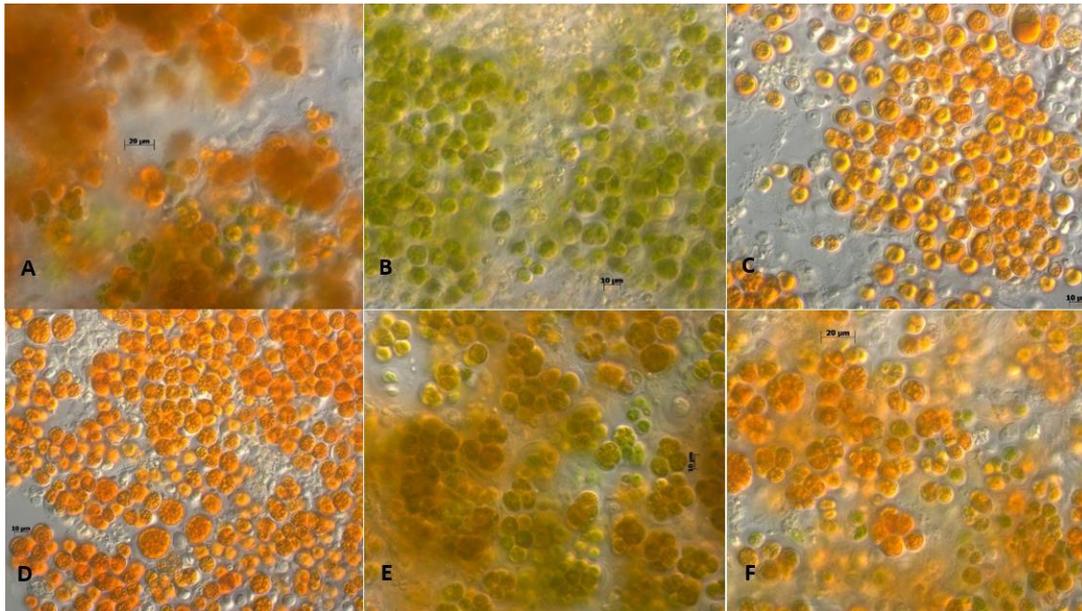


Figure 47 : Photographies obtenues par microscope optique (x400) de *Pleurastrum sp.* après 24 jours de culture en phase rouge. A : flocs et cellules en suspension dans du BBM-N+NaCl, B : flocs et cellules en suspension en carence naturelle, C : flocs dans du BBM-N, D : flocs dans du BBM-N+NaCl, E : flocs dans du BBM-P, F : flocs dans du BBM (témoin).

3.1.4.2 Quantification des pigments

Les résultats de la quantification des pigments, chlorophylles et caroténoïdes totaux, sont représentés dans la **Figure 48**. Les flocs stressés dans le milieu BBM-N ainsi que dans le milieu BBM-N+NaCl ont présenté une pigmentation rouge-orange prononcée. Leurs teneurs en caroténoïdes totaux étaient de 5,1 mg/g MS et de 4,3 mg/g MS, respectivement. Ces valeurs élevées sont attribuées à la production significative de caroténoïdes secondaires rouge-oranges permettant à la microalgue de survivre et de se protéger face à des telles conditions. Parallèlement, les chlorophylles ont été présentes en faible teneur, soit 2,3 à 1 mg/g MS.

Les deux mélanges de flocs et cellules en suspension, soumis au stress dans le milieu BBM-N+NaCl et en carence naturelle, ont présenté les plus faibles teneurs en pigments. Leurs teneurs en chlorophylles a et b étaient inférieures à 1 mg/g MS et les caroténoïdes totaux n'ont pas dépassé 1,5 mg/g MS. En effet, lorsque les cellules en suspension sont exposées au stress oxydatif ou limitation en nitrate, elles semblent ne pas survivre et finir par mourir. Cela a réduit la teneur en pigments du mélange.

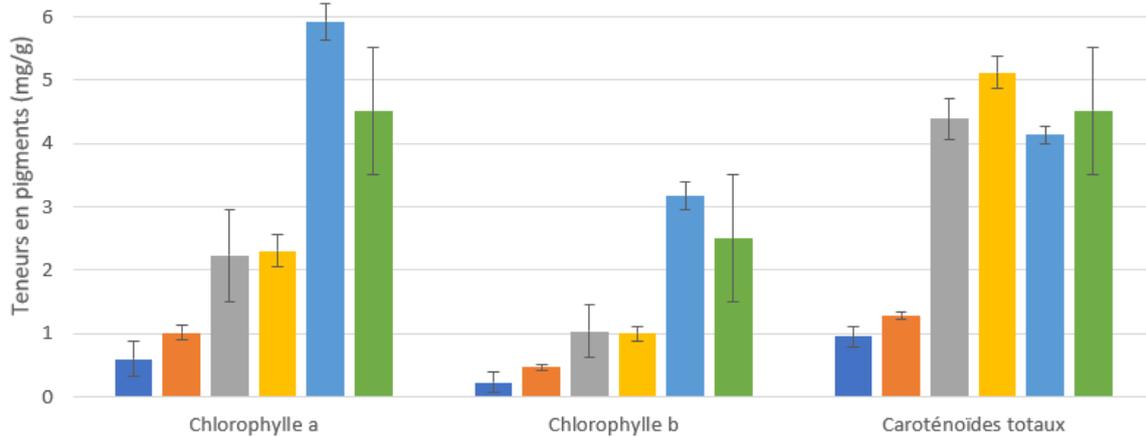


Figure 48 : Teneurs en pigments des cultures de *Pleurastrum sp.* après 24 jours de stress. Cultures des floccs et des cellules en suspension en milieu BBM-N+NaCl (●), et en carence naturelle du milieu B3N issu du PBR (●), Culture de floccs seuls en milieux BBM-N (●), BBM-N+NaCl (●), BBM-P (●) et BBM (●).

Les deux cultures de floccs en milieux BBM et BBM-P ont présenté une teneur en caroténoïdes totaux similaire aux milieux BBM-N+NaCl et BBM-N. Cette similarité est probablement attribuée à la lutéine, caroténoïde primaire. Ce pigment jaune est présent en parallèle des chlorophylles dont la microalgue a besoin pendant la photosynthèse. En outre, l'observation au microscope a révélé une présence abondante de kystes verts à côté de kystes oranges. Cela nous a permis de constater que la lutéine est le caroténoïde le plus abondant dans ces deux conditions.

La limitation d'azote et le stress salin semblent avoir eu un impact positif sur l'accumulation de caroténoïdes totaux dans les floccs. Ces derniers sont principalement des caroténoïdes secondaires responsables de la teinte orange. Ils comprennent l'astaxanthine et dérivés tels que la canthaxanthine et l'adonixanthine, avec une présence notable de la lutéine. La teneur a atteint 5,1 mg/g MS, dépassant celle obtenue par une combinaison de deux facteurs-par carence en azote avec une forte intensité lumineuse de 800-900 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ à 10 °C, qui a donné une teneur de 2,9 mg/g MS, comme déterminé dans l'étude (Leya et al., 2009).

Nous avons remarqué que lorsque l'azote n'est plus disponible et que les microalgues sont soumises à un stress salin, elles ne peuvent plus produire de composés azotés tels que les chlorophylles et les protéines. Par conséquent, elles réorientent leur biosynthèse vers d'autres composés comme l'amidon, les lipides et les caroténoïdes. Ce mécanisme de protection permet aux caroténoïdes, qui jouent un rôle important en tant que pigments accessoires, de maintenir les réactions de photosynthèse. Chez *Dunaliella salina*, Sedjati et al., (2019) ont observé qu'il existe une relation inversement proportionnelle entre les niveaux de chlorophylle a et le rapport des caroténoïdes à la chlorophylle a, ce rapport augmentant avec l'augmentation de la salinité.

Ces résultats ont soulevé la question de la diversité des pigments que la microalgue *Pleurastrum sp.* peut accumuler sous différents stress abiotiques. Pour mieux comprendre cet impact, un plan d'expériences a été élaboré pour induire la phase rouge. Avec l'analyse de pigments par la méthode HPLC-UV, il est désormais possible de quantifier les divers pigments. Une étude plus approfondie de ces aspects est présentée dans la partie suivante.

3.2 Étude approfondie de la phase rouge en fiole Erlenmeyer

3.2.1 Méthodologie de l'étude approfondie

Le plan d'expériences mis en œuvre est composé de 8 différentes conditions, réalisées uniquement sur des flocs de *Pleurastrum sp.* L'objectif est d'étudier les effets combinés des facteurs de stress comme la haute intensité lumineuse, la carence en nitrate ou en phosphate, et la salinité sur la production de caroténoïdes et la vitesse de transition du vert au rouge.

Pour cela, un autre PBR a été réalisé pour cultiver *Pleurastrum sp.* sous forme de flocs en phase verte pendant 100 jours. La microalgue a été produite dans ses conditions préférentielles à 12 °C, dans le milieu B3N enrichi avec du bicarbonate de sodium et des vitamines. Le volume de la culture était de 2,5 L initialement, puis a atteint 5 L au fur et à mesure des rafraîchissements.

Afin de concentrer la culture en flocs et de minimiser leur accumulation en biofilms sur la paroi apicale du PBR, le milieu de culture neuf et autoclavé a été acheminé du haut vers le bas par un tuyau passant par une pompe péristaltique. Cela a été mis en place avant que la culture ne tombe en carence en nutriments. Le suivi de la culture de flocs de *Pleurastrum sp.* est effectué en mesurant l'évolution de la matière sèche et la quantité de nutriments dans le milieu de culture.

Une fois que la quantité de biomasse a atteint un niveau suffisant, la récolte est effectuée pour démarrer l'étude des facteurs de stress selon le plan d'expériences. Pour cela, un litre de culture de *Pleurastrum sp.* est récupéré dans une bouteille en arrêtant l'aération, pour favoriser la décantation des flocs, puis en ouvrant la vanne de purge du PBR. La bouteille a été placée sur une plaque d'agitation pour garantir l'homogénéité des prélèvements de flocs pour tous les tests.

50 mL à 0,9 g/L de MS de culture ont été prélevés et placés dans une fiole Erlenmeyer de 100 mL, puis laissés à décanter. Après sédimentation des flocs, l'ancien milieu de culture du PBR a été prélevé et remplacé par un nouveau milieu carencé du plan d'expériences. Pour réaliser les 8 conditions de stress en triplicata (voir **Tableau 15**), en suivant la même méthodologie sur les flocs seuls, cela a conduit à suivre la culture dans 24 fioles.

Ensuite, pour favoriser le démarrage de la phase rouge, une haute intensité lumineuse de 325 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ a été appliquée. Cette combinaison de facteurs de stress a été suivie dans le photo-incubateur pendant 21 jours. À la fin du test, les 50 mL de chaque condition ont été divisés en deux : 25 mL pour mesurer la matière sèche finale et observer les flocs au microscope, et 25 mL pour analyser la teneur en pigments après lyophilisation.

3.2.2 Résultats de l'étude approfondie

3.2.2.1 Suivi de la production de biomasse

Le suivi de la culture a démontré que *Pleurastrum sp.* est capable de se développer exclusivement en flocs dans le PBR. Après les dix premiers jours, le taux de croissance exponentiel était de 0,2 jour⁻¹ et la matière sèche a continué à augmenter jusqu'à atteindre 0,85 g/L au 93^{ème} jour. Cette production en phase verte de *Pleurastrum sp.* en flocs a permis d'obtenir un taux de croissance similaire à celui rapporté par Leya et al., (2009) de 0,2 jour⁻¹.

3.2.2.2 Observation visuelle et microscopique

À la fin des 21 jours de stress, *Pleurastrum sp.* a réagi de manière notablement différente aux conditions stressantes appliquées **Tableau 16**.

Les changements visibles et microscopiques sur les flocs indiquent qu'il y a eu une induction de l'accumulation des caroténoïdes de stress par rapport à l'état initial.

Au début, nous avons suggéré qu'un effet positif soit lié à la carence en nitrate, qui s'est rapidement traduit par une transition de la couleur verte initiale à l'orange en une semaine (condition B). De la même manière, les autres conditions combinant cette carence en azote avec la carence en phosphate et le stress salin ont viré vers l'orange en une semaine, en particulier les conditions D, F et H. Cette pigmentation observée semble progressivement virer vers le rouge au cours de la 3^{ème} semaine, marquant ainsi la fin de culture. En revanche, l'effet de la carence en phosphate a été moins prononcé, car la culture de la condition (C) n'a pu devenir orange que lorsqu'elle a été combinée avec le stress salin dans la condition (G) à la fin de la 3^{ème} semaine. L'effet du stress salin dans la condition (E) semble ne pas avoir eu un impact significatif, car la culture était marron-vert foncé à la fin du stress.

Tableau 16 : Couleur des cultures de *Pleurastrum sp.* observée sous les 8 différentes conditions de stress, après la 1^{ère} et 3^{ème} semaine de stress.

Conditions/Milieux de stress	Couleur des cultures	
	Fin de la 1 ^{ère} semaine	Fin de la 3 ^{ème} semaine
A : BBM (témoin)	vert foncé	marron/orange
B : BBM-N	orange	orange-foncé
C : BBM-P	vert foncé	marron/orange
D : BBM-N-P	orange	rouge
E : BBM+S	vert foncé	marron
F : BBM+S-N	orange	rouge
G : BBM+S-P	vert foncé	orange
H : BBM+S-N-P	orange	rouge

Ces observations ont été confirmées au microscope, comme le montre la **Figure 49** et **Figure 50**. Les kystes entièrement oranges et regroupés, ont tous un diamètre entre 10 et 20 µm. Dans la condition combinant la carence en nitrate et en phosphate (condition D), les kystes contiennent des gouttelettes de caroténoïdes secondaires, ainsi qu'une petite partie cytoplasmique verte à jaune.

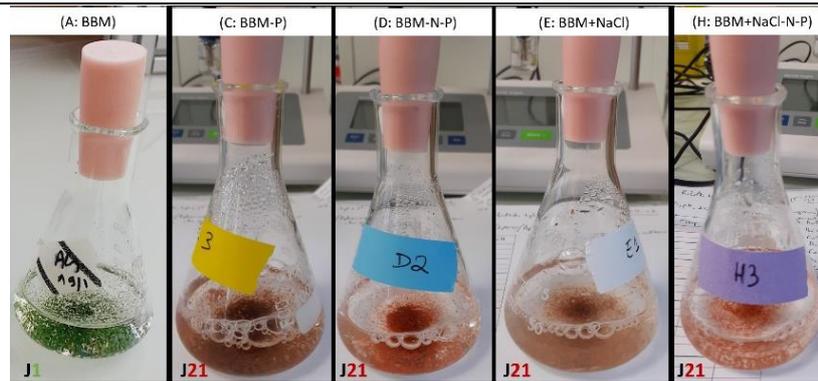


Figure 49 : Photographies des flocs de *Pleurastrum sp.* dans des fioles Erlenmeyers sous diverses conditions de stress ont été prises à l'état initial (phase verte) et à l'état final du stress après 21 jours (phase rouge).

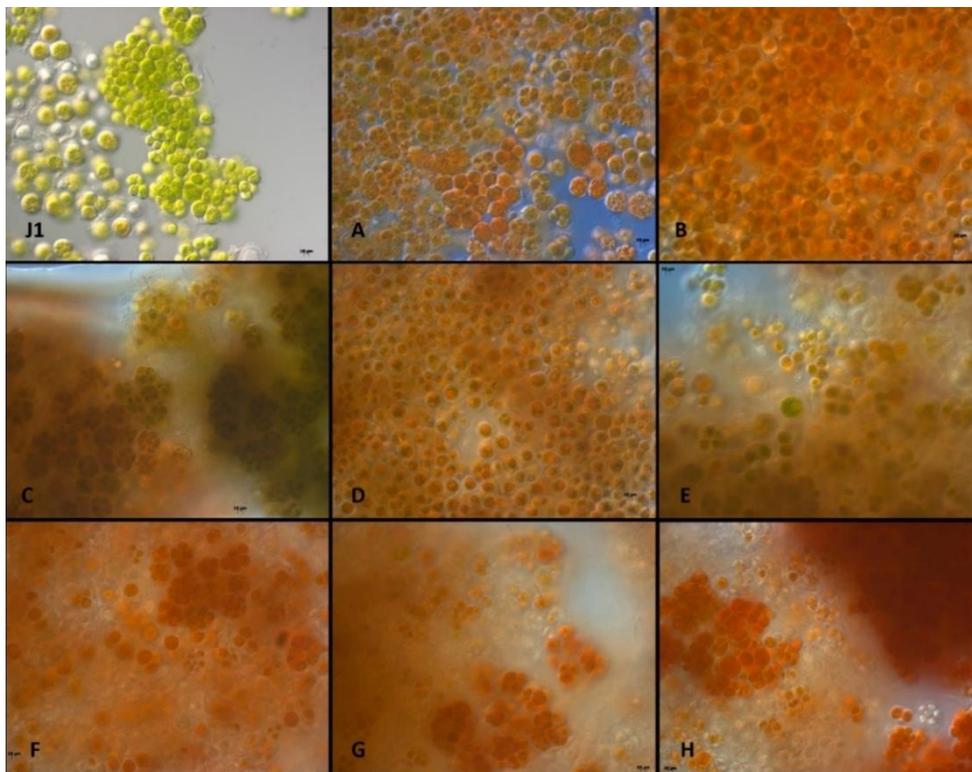


Figure 50 : Photographies obtenues par microscope optique (x400) de *Pleurastrum sp.* après 21 jours de culture en phase rouge. J1 : Flocs issus du PBR le jour 1 représentant l'état initial en phase verte/début du stress. A: BBM (témoin), B: BBM-N, C: BBM-P, D: BBM-N-P, E: BBM+NaCl, F: BBM+NaCl-N, G: BBM+NaCl-P et H: BBM+NaCl-N-P.

3.2.2.3 Quantification des pigments

Les résultats de quantification des chlorophylles et des caroténoïdes totaux sont rassemblés dans la **Figure 51**. Ils ont révélé que l'exposition des flocs de *Pleurastrum sp.* à une forte intensité lumineuse dans le milieu BBM (témoin), ou combiné à une carence en phosphate (C), a conduit à la plus haute teneur en caroténoïdes totaux, soit 5,3 mg/g MS. Cette valeur, la plus élevée parmi toutes les autres conditions, avait déjà été notée lors du stress préliminaire fait sur des flocs dans les mêmes conditions dans l'étude préliminaire.

La carence en phosphate seule n'a pas eu d'impact significatif sur les teneurs finales en pigments. Cela pourrait être expliqué par le fait que le phosphore ne joue pas un rôle dans le métabolisme du stress chez *Pleurastrum sp.*, qui arrête sa croissance et ralentit son activité photosynthétique en phase rouge.

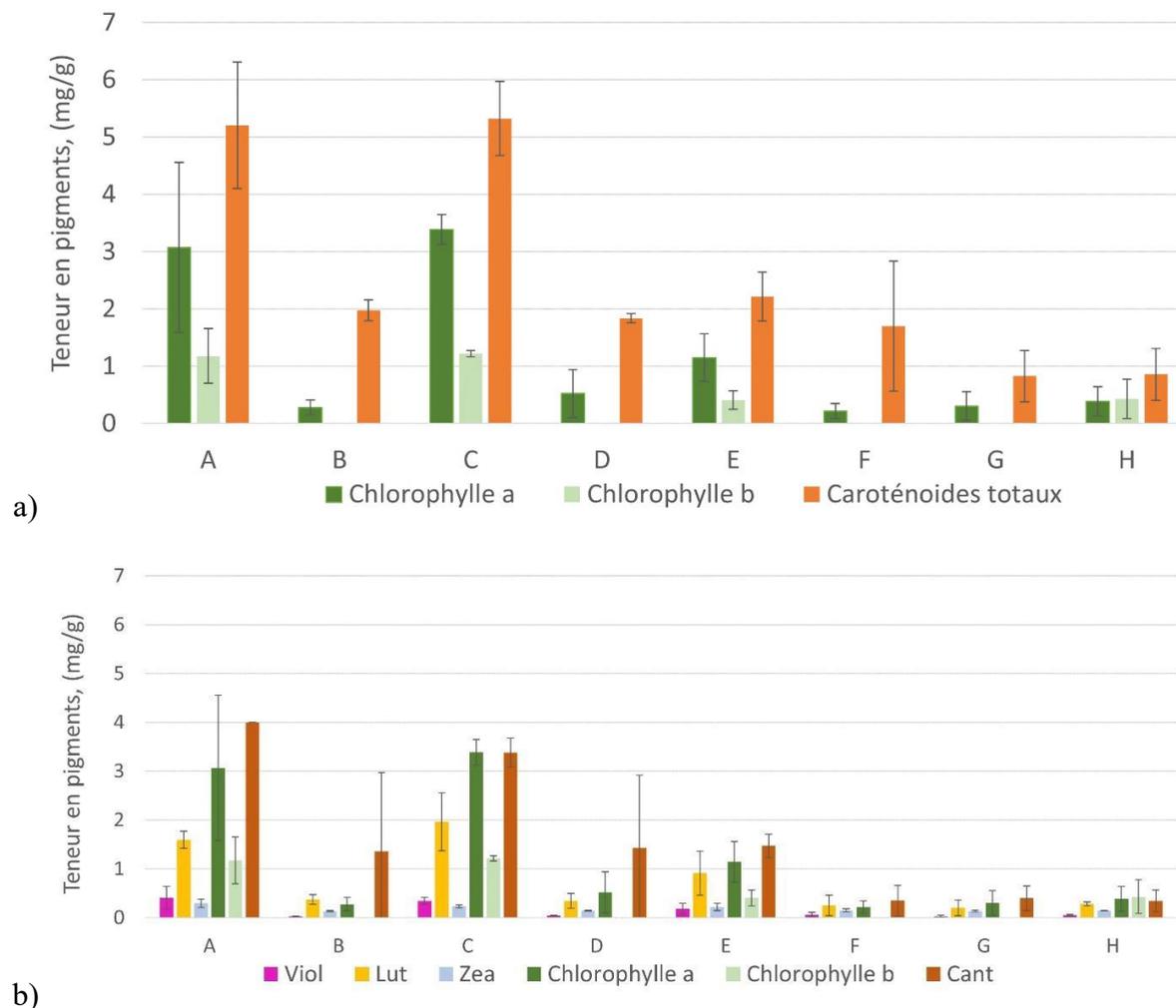


Figure 51 : a) Teneurs en chlorophylles et caroténoïdes totaux, b) Teneurs en caroténoïdes des cultures de *Pleurastrum sp.* après 21 jours de stress (état final). A: BBM (témoin), B: BBM-N, C: BBM-P, D: BBM-N-P, E: BBM+NaCl, F: BBM+NaCl-N, G: BBM+NaCl-P et H BBM+NaCl-N-P. Viol : violaxanthine, Lut : lutéine, Zea :zéaxanthine, Cant :canthaxanthine.

Les barres d'erreur indiquent les écarts-types entre les triplicatas.

En outre, les pigments mesurés par la méthode HPLC étaient principalement des composés intermédiaires. L'absence de l'astaxanthine dans toutes les conditions pourrait être due à une conversion lente à partir de ces pigments intermédiaires. Néanmoins, il a été observé que *Pleurastrum sp.* produisait davantage de canthaxanthine et de lutéine que d'autres pigments. Cette observation est particulièrement notable dans le cas de la carence en phosphate et le stress salin, (conditions C et E), où la canthaxanthine représente environ 70% des caroténoïdes totaux, soit 4 mg/g MS, avec 21% de lutéine. Les xanthophylles, violaxanthine et zéaxanthine, étaient présents en très faibles quantités.

Par contre, dans les quatre autres conditions ayant pour point commun la carence en nitrate (B, D, F et H), la teneur en caroténoïdes totaux était 2,5 fois plus faible à celles des conditions A et C. Ces caroténoïdes quantifiés sont principalement composés de canthaxanthine à 63%, avec une très faible teneur en lutéine. Cette observation indique clairement que la carence en azote a influencé négativement l'accumulation des caroténoïdes secondaires chez *Pleurastrum sp.*, malgré que le fait que cette carence a entraîné une transition plus rapide du vert à l'orange en une semaine.

D'un autre côté, le stress oxydatif causé par une salinité élevée semble entraîner une diminution des teneurs en pigments si le stress dure plus d'une semaine. Cette diminution pourrait s'expliquer par la concentration élevée en NaCl de 6 g/L utilisée, qui a probablement affecté l'accumulation des caroténoïdes.

3.3 Étude de la phase rouge à l'échelle du photo-bioréacteur

Une production a été réalisée en utilisant des floccs produits dans le PBR en B3N, mais avec quelques variations. Un litre contenant des floccs a été récolté par centrifugation. La biomasse a ensuite été lavée avec un nouveau milieu de BBM sans azote et sans NaCl, de 900 mL, complété par 100 mL de B3N contenant du bicarbonate et des vitamines. Ceci a été fait pour assurer la survie de la microalgue dans le PBR qui ne possédait pas de source de CO₂ ni d'une pierre poreuse.

Par la suite, la culture a été placée dans un PBR similaire à une colonne d'extraction (utilisé provisoirement avant la réception des deux autres PBR pour la suite des expériences). Pendant les premières 24 heures, l'éclairage était de 140 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, fourni par deux néons LED, puis il a été augmenté à environ 560 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ en ajoutant une lampe. Le stress a duré trois semaines (voir **Annexe 3**).

Enfin, peu de biomasse a été récoltée, en raison de la difficulté de récolte rencontrée, mais elle a été analysée. Les résultats de la quantification des pigments seront comparés avec ceux de *Sphaerocystis sp.* en phase verte et rouge. Un autre essai avait été fait en PBR mais il n'a pas fonctionné en raison d'une contamination.

4 Expériences sur *Sphaerocystis sp.*

4.1 Étude préliminaire de la phase rouge en fiole Erlenmeyer

4.1.1 Méthodologie de l'étude préliminaire

Pour étudier la production de pigments par *Sphaerocystis sp.* durant la phase verte et la phase rouge, des expériences ont été menées sous cinq différentes conditions de stress en association avec un stress lumineux de haute intensité, sur une période de deux semaines. Le milieu BBM a été utilisé comme témoin (A), et les autres milieux de culture étaient soit carencés, soit carencés à forte salinité, comme suit : B (BBM-N), D (BBM-N-P), F (BBM+NaCl-N), et H (BBM+NaCl-N-P).

Au départ, un premier photo-bioréacteur a été inoculé à une température de 12 °C et a été suivi pendant deux mois en phase verte. Étant donné la sensibilité de la microalgue à la lumière en phase verte, l'éclairage a été fourni par deux néons émettant 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Ce PBR a été inoculé avec un volume initial de 900 mL de culture issue de trois fioles Erlenmeyers cultivées en photo-incubateur. Le volume total a été complété à 2 L avec un milieu BBM enrichi en vitamines. Finalement, le volume de la culture a été progressivement augmenté jusqu'à atteindre 5 L. La réalimentation du PBR en nitrate a été réalisée avant que la culture ne tombe en carence.

Lorsqu'une quantité suffisante de biomasse est obtenue au 31^{ème} jour, un litre de cette culture est récolté et réparti en cinq triplicatas dans des tubes Falcon de 50 mL, centrifugés à 10 000 rpm à 4 °C pendant 10 min. Le culot de centrifugation est rincé une fois à l'eau milli-Q puis recentrifugé afin d'éliminer toutes traces de l'ancien milieu.

Pour provoquer le stress, les réplicas ont été transférés dans des fioles Erlenmeyer de 150 mL contenant 50 mL de BBM comme témoin ou 50 mL de milieux de culture carencés ou de forte salinité. Après l'inoculation, les cultures sont initialement incubées pendant 24 h à une intensité lumineuse de 78 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, elle est ensuite augmentée à 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ en phase de jour durant deux semaines de stress. Cette méthode a été inspirée de la publication de Leya et al., (2009), mettant en œuvre un stress lumineux en deux étapes. À la fin du stress, les 50 mL de chaque condition ont été séparés en deux portions égales : une portion de 25 mL a été utilisée pour déterminer la matière sèche et pour l'observation des cellules au microscope, tandis que la deuxième portion a été lyophilisée, traitée, puis utilisées pour l'extraction et l'analyse des pigments.

4.1.2 Résultats de l'étude préliminaire

4.1.2.1 Observation visuelle et microscopique

Quelle que soit la condition de stress appliquée, la réponse de *Sphaerocystis sp.* a été visible en fiole dès la première semaine avec un changement de couleur passant du vert initial au jaune orangé, puis de l'orange au rouge à la fin de la 2^{ème} semaine, marquant ainsi la fin de la culture (voir **Tableau 17** et **Figure 52** et **Figure 53**).

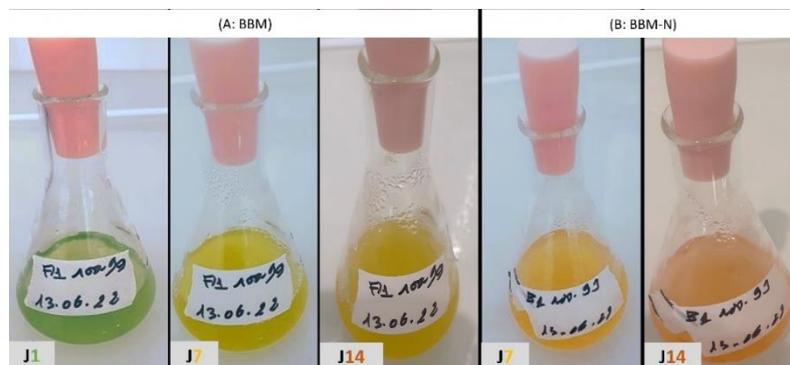


Figure 52 : Photographies de *Sphaerocystis sp.* dans des fioles Erlenmeyers sous quelques conditions de stress ont été prises à trois moments différents : à l'état initial en phase verte, au 7^{ème} jour de stress (état intermédiaire), et à la fin du stress au 14^{ème} jours (état final).

Tableau 17 : Couleur des cultures de *Sphaerocystis sp.* observée sous les cinq différentes conditions de stress, après la 1^{ère} et 2^{ème} semaine de stress.

Conditions/Milieus de stress	Couleur des cultures	
	Fin de la 1 ^{ère} semaine	Fin de la 2 ^{ème} semaine
A : BBM (témoin)	jaune	jaune foncé
B : BBM-N	jaune orangé	orange à rouge
D : BBM-N-P	jaune orangé	orange à rouge
F : BBM+S-N	jaune orangé	orange à rouge
H : BBM+S-N-P	jaune orangé	orange à rouge

Les modifications observables à l'œil nu ont été confirmées au microscope. D'après l'observation cellulaire, les cellules vertes, dont le diamètre varie de 5 à 10 μm , se sont agrégées entre elles pour former des kystes oranges d'environ 18 à 20 μm de diamètre. Ce diamètre est similaire à celui observé chez *Dunaliella salina* et *Dunaliella bardawil*. Ces dernières peuvent atteindre un diamètre de 25 μm au stade orange. Par ailleurs, la microalgue *H. pluvialis*, lorsqu'elle est enkystée, atteint environ 60 μm de diamètre tels que décrit dans le premier chapitre bibliographique.

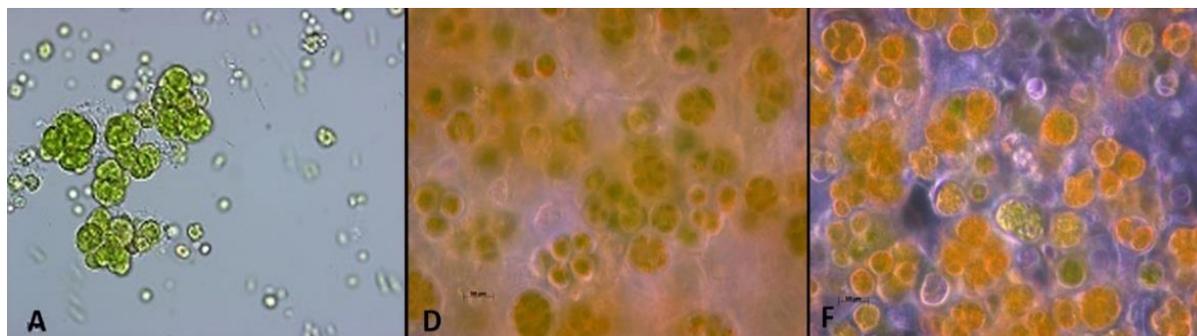


Figure 53 : Photographies obtenues par microscope optique (x400) de *Sphaerocystis sp.* après 14 jours de culture en phase rouge. A : cellules à l'état initial (phase verte/début de phase rouge) dans le milieu BBM, D : cellules dans le milieu D de BBM-N-P, F : cellules dans le milieu de BBM+NaCl-N.

4.1.2.2 Quantification des pigments

Lors de la phase verte et en présence de nutriments, notamment l'azote la microalgue *Sphaerocystis sp.* produit majoritairement des chlorophylles a et b (**Figure 54**). Leur taux respectifs sont de 10 mg/g et de 7 mg/g. Les caroténoïdes sont présents en plus faible teneur, 1,53 mg/g et sont principalement représentés par la lutéine et les xanthophylles (zéaxanthine et violaxanthine).

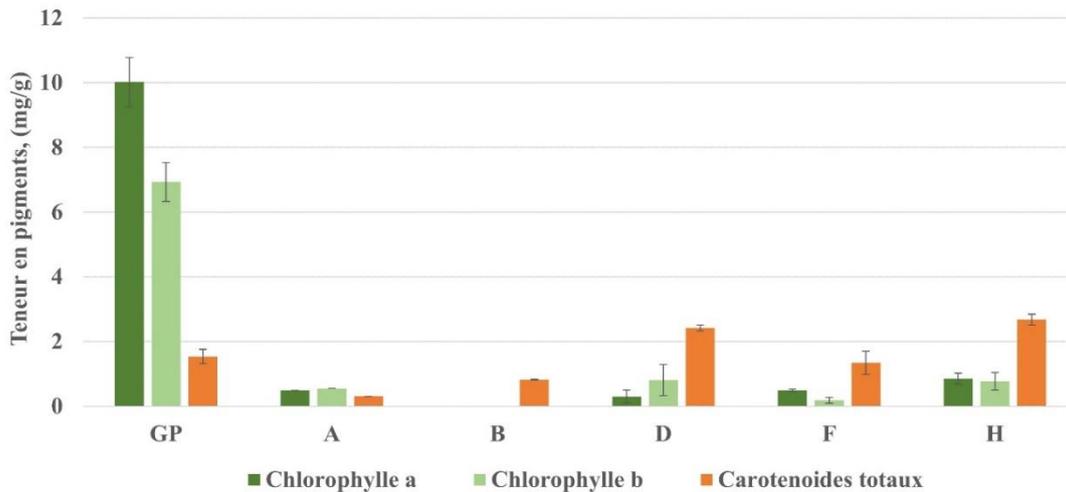


Figure 54 : Teneurs en chlorophylles et caroténoïdes totaux des cultures de *Sphaerocystis sp.* en phase verte GP (état initial au début du stress), et après deux semaines de stress de la phase rouge (état final) sous les conditions : A: BBM (témoin), B: BBM-N, D: BBM-N-P, F: BBM+NaCl-N, et H: BBM+NaCl-N-P.

Dans la condition A de BBM (témoin), la teneur en caroténoïdes totaux était seulement de 0,3 mg/g, comparativement à une moyenne de 0,5 mg/g pour la chlorophylle a et la chlorophylle b. En revanche, dans la condition B de BBM-N, il n'y avait aucune trace de chlorophylles et la teneur en caroténoïdes était, seulement 0,82 mg/g. Cela suggère que lorsqu'elle est soumise à un stress lumineux intense dans un milieu initialement riche en nutriments tels que l'azote, *Sphaerocystis sp.* entre d'abord en déficit d'azote, ce qui dure environ une semaine (la première semaine de stress). Par la suite, elle s'adapte au stress en produisant des caroténoïdes secondaires pendant deux semaines. Si le stress avait été prolongé d'environ une semaine supplémentaire, la culture aurait probablement pris une teinte orange. Cependant, même en commençant avec une carence initiale en azote (condition B), il semble que la microalgue ne soit pas capable de produire autant de caroténoïdes que la culture témoin. Néanmoins, étant donné que la culture dans le BBM-N a viré complètement à l'orange après les deux semaines de stress, ses caroténoïdes sont principalement représentés par des caroténoïdes secondaires tels que la canthaxanthine et l'astaxanthine, avec une dégradation totale des chlorophylles.

La valeur obtenue de 0,82 mg/g de caroténoïdes secondaires est relativement similaire à celle de 0,71 mg/g obtenue par T. Leya dans les 2,1 mg/g de caroténoïdes (primaires, xanthophylles et secondaires) dans des conditions de stress similaires.

Pour les autres conditions, la culture sous la condition H de BBM+NaCl-N-P s'est distinguée par la teneur la plus élevée en caroténoïdes, soit 2,68 mg/g. Cette teneur correspond aux caroténoïdes primaires, xanthophylles et secondaires et elle est légèrement supérieure à 2,1 mg/g de caroténoïdes totaux (primaires, xanthophylles et secondaires) de T. Leya, bien que les conditions opératoires soient différentes. Elle a été suivie de près par la culture sous la condition D de BBM-N-P avec 2,42 mg/g, et ensuite par la culture sous la condition F de BBM+NaCl-N avec 1,32 mg/g. Leur teneur en chlorophylles a fluctué entre 0,18 et 0,86 mg/g.

D'après ces résultats, il est constaté que la combinaison de deux carences initiales, en azote et en phosphore, avec ou sans une salinité élevée dans le milieu, a stimulé une production finale élevée de caroténoïdes, primaires, xanthophylles et secondaires.

Cependant, c'est uniquement le stress provoqué par une carence initiale en azote combinée à une lumière intense qui a conduit à la production principale de caroténoïdes secondaires, notamment la canthaxanthine et astaxanthine.

À partir de ces résultats, il est compris que la carence en azote (induite ou naturelle), associée à une lumière intense, est la meilleure condition testée pour produire les deux caroténoïdes d'intérêt, la canthaxanthine et l'astaxanthine, à partir de culture de *Sphaerocystis sp.*

Compte tenu du fait que l'azote a été identifié comme un nutriment essentiel pour la croissance et le stress chez *Sphaerocystis sp.*, une étude comparative a été menée sur trois milieux de culture, se distinguant par leur forme d'azote. Cette étude vise à prévoir le suivi de culture pendant la croissance et le stress, à l'échelle du PBR.

4.2 Étude complémentaire de la phase rouge en fiole Erlenmeyer

4.2.1 Méthodologie de l'étude complémentaire

Pour déterminer le milieu de culture le plus propice à la croissance de la souche *Sphaerocystis sp.*, et à sa transition rapide vers la phase rouge via une carence naturelle en azote, trois milieux de culture ont été testés : TAP, BNH4 et B3N. Les milieux se distinguent principalement par la forme d'azote utilisée. Le milieu B3N contient du nitrate, tandis que les milieux TAP et BNH4 contiennent de l'ammonium. Le milieu TAP contient également une petite quantité d'acétate, qui sert de source de carbone organique.

Initialement, les cultures ont été réalisées en triplicata sur une période de deux semaines, comprenant une semaine de phase verte suivie d'une de phase rouge avec induction par l'augmentation de l'intensité lumineuse. En raison d'une erreur de manipulation, le milieu BNH4 a été préparé avec une quantité de nitrate trois fois inférieure à celle prévue. Les cultures ont été inoculées avec un volume initial de 50 mL dans des fioles de 150 mL et des échantillons ont été prélevés quotidiennement pour diverses analyses.

Par la suite, l'expérience n'a été reproduite que sur le milieu TAP et BNH4 avec des modifications de certains paramètres pour permettre une conclusion définitive sur cette étude comparative. Le milieu BNH4 a été préparé avec une concentration en azote équivalente à celle du milieu B3N. Les cultures ont été réalisées dans des fioles Erlenmeyers de 250 mL, sur une durée de 33 jours. Le volume initial des cultures était de 100 mL, avec une DO de 0,1 et des prélèvements quotidiens ont servi pour diverses analyses. Le pH a été régulièrement contrôlé à l'aide de papier pH et ajusté avec du NaOH si nécessaire pour maintenir un pH de 7-8. La première phase verte a duré huit jours, suivie d'une phase rouge de 25 jours, pendant laquelle la luminosité a été augmentée pour atteindre 225 à 310 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ pendant la phase diurne.

4.2.2 Résultats de l'étude complémentaire

4.2.2.1 Suivi de croissance

D'après le suivi de l'évolution de DO, il apparaît que la croissance est relativement linéaire avec une phase de latence entre 0 et 2 jours. Vu l'incertitude de certaines mesures et l'absence de mesure le 5^{ème} et 6^{ème} jour, notre estimation du taux croissance a été faite sur une période entre le 2^{ème} et 8^{ème} jour, sur les trois milieux de culture, pour pouvoir les comparer (voir la Figure 55).

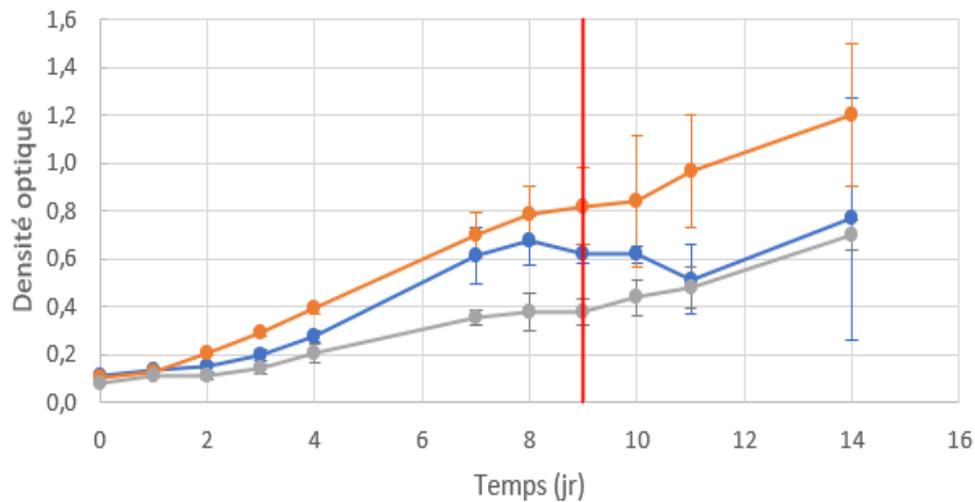


Figure 55 : Suivi de la croissance de *Sphaerocystis sp.* en TAP (●), BNH4 (●) et B3N (●) pendant la phase verte et la phase rouge. Les phases sont séparées par un trait vertical rouge. Les barres d'erreur indiquent les écarts types entre les triplicatas.

Les taux de croissance estimés pour le BNH4, le TAP et le B3N sont respectivement $0,22 \text{ jour}^{-1}$, $0,25 \text{ jour}^{-1}$ et $0,20 \text{ jour}^{-1}$, révélant ainsi une similarité notable. Cette observation suggère que la souche a démontré une capacité à croître indépendamment de la forme d'azote utilisée, qu'il s'agisse d'ammonium ou de nitrate.

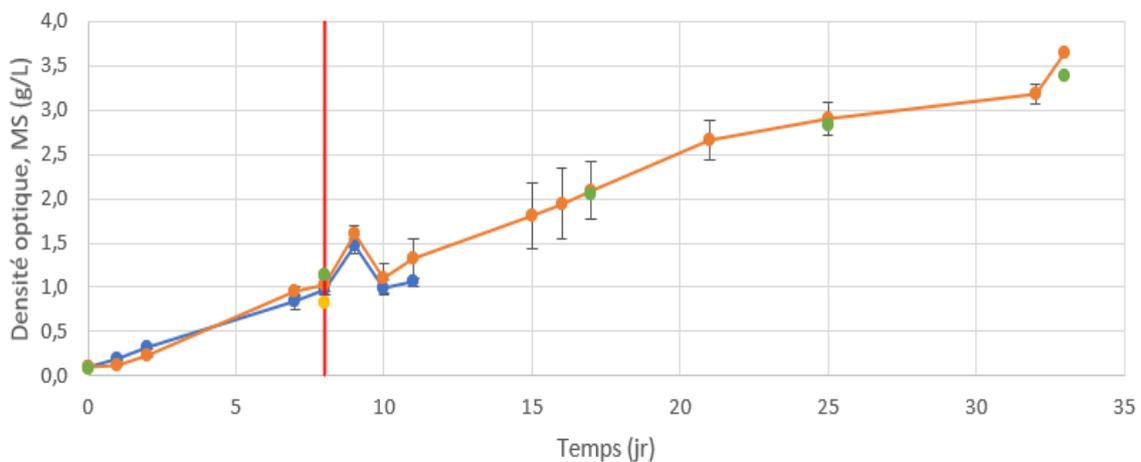


Figure 56 : Suivi de croissance de la répétition de culture de *Sphaerocystis sp.* par la DO en TAP (●) et BNH4 (●) et par la MS en TAP (●) et BNH4 (●) pendant la phase verte et la phase rouge. Les phases sont séparées par un trait vertical rouge.

Cependant, contrairement aux deux autres milieux, la culture dans le milieu TAP a formé des biofilms de densité variable sur les parois des fioles entre les réplicats. Ces biofilms n'étaient donc pas pris en compte dans les résultats de DO, ce qui a probablement conduit à une sous-estimation de la croissance dans ce milieu.

En effet, plusieurs échantillons ont été prélevés, dont trois prélèvements de 10 mL pour des MS, en plus des prélèvements quotidiens pour la DO. Cela a entraîné une pression excessive sur les cultures, en plus de l'évaporation. Le volume final réduit et les biofilms produits en TAP ont contribué en partie aux différences observées entre les milieux.

En raison de la faible teneur en azote du milieu BNH4 due à une erreur lors de sa préparation, et des écarts considérables entre les triplicatas en milieu TAP, l'expérience a été reconduite avec des volumes initiaux accrus et un milieu BNH4 reformulé pour correspondre à la concentration en azote du B3N.

Cette fois-ci, la croissance obtenue a été relativement similaire en TAP et en BNH4 pendant la phase verte, avec des taux de croissance estimés respectivement à $0,18 \text{ jour}^{-1}$ et $0,25 \text{ jour}^{-1}$ (voir **Figure 56**). Cette observation est pratiquement similaire à celle de la première fois lorsque le BNH4 utilisé était 3 fois moins concentré en azote que le B3N.

Lors de la phase rouge déclenchée par l'intensification de la lumière et la déficience en azote du milieu, une mortalité cellulaire importante a été observée dans les deux milieux. Au 6^{ème} jour de cette phase rouge, les cultures en TAP sont devenues transparentes, indiquant une mort cellulaire, tandis que les cultures en BNH4 ont viré à l'orange, ce qui signifie qu'il y a eu une production de caroténoïdes secondaires.

4.2.2.2 Suivi de la consommation des nutriments

La similarité entre les taux de croissance observée est cohérente avec nos observations concernant la consommation d'azote (**Figure 57**). Bien que la concentration initiale en azote était plus faible, le milieu BNH4 a montré une croissance satisfaisante. L'azote a été épuisé, mais la croissance a persisté même dans un milieu déficient en azote.

Il convient de souligner que des ajustements manuels du pH avec du NaOH ont été nécessaires pour le milieu BNH4. Le pH a chuté à 3,2 après 24 heures de culture, indiquant que le milieu manquait de capacité tampon, ce qui signifie que ce milieu était moins adapté malgré la croissance satisfaisante observée.

La différence de survie entre les milieux pourrait être attribuée au fait que l'azote avait déjà été entièrement consommé dans les cultures en TAP pendant la phase verte, alors qu'il en restait pour les cultures en BNH4 lors de l'induction de la phase rouge, en raison d'une concentration initiale en azote plus élevée dans le BNH4.

Par conséquent, les cultures en milieu TAP, n'ayant plus de source d'azote lors de la transition vers la phase rouge, n'ont pas pu s'adapter en réponse au stress, ce qui a conduit à la mort cellulaire. Il semble alors qu'une concentration résiduelle en azote au début de la phase rouge était nécessaire.

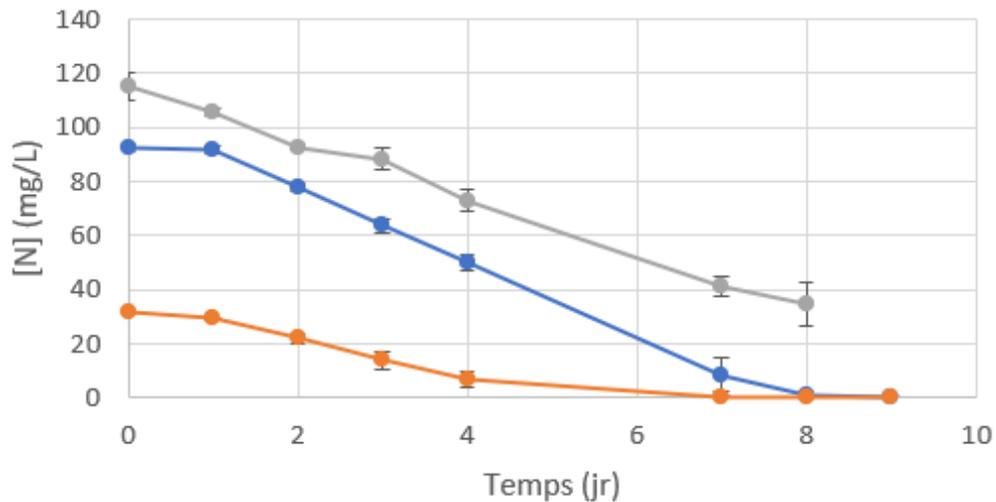


Figure 57 : Suivi de la concentration en azote dans la culture de *Sphaerocystis sp.* en TAP (●), BNH4 (●) et B3N (●) pendant la phase verte. Les barres d'erreur indiquent les écarts types entre les triplicatas.

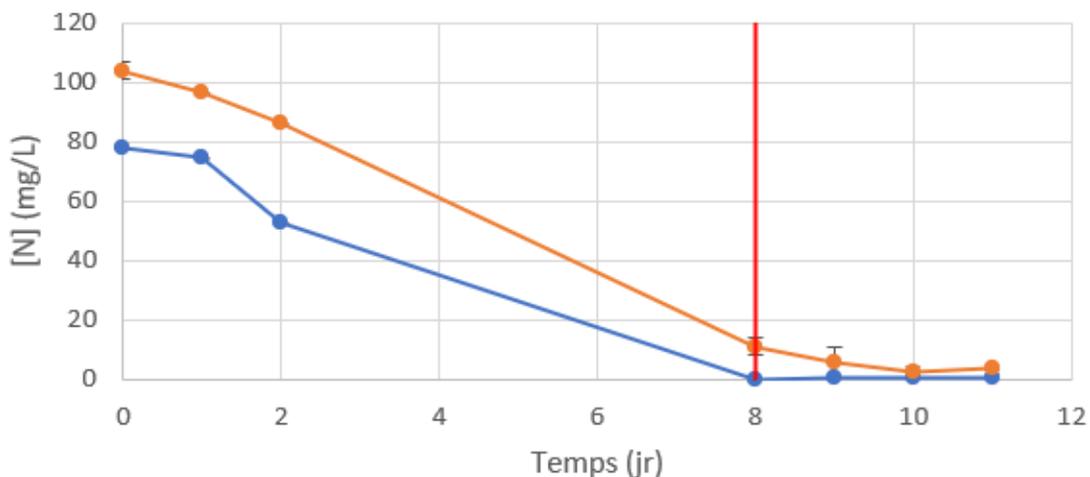


Figure 58 : Suivi de consommation en azote des répétitions de culture de *Sphaerocystis sp.* en TAP (●) et BNH4 (●). Les phases sont séparées par un trait vertical rouge, et les barres d'erreur indiquent les écarts types entre les triplicatas.

4.2.2.3 Quantification des pigments

La culture en BNH4 a été maintenue pendant 25 jours en phase rouge, soit 3,6 fois plus longtemps que lors de la première expérience. L'objectif était de voir si une phase rouge prolongée pourrait entraîner une production accrue en caroténoïdes secondaires, et notamment la conversion de la canthaxanthine en astaxanthine.

Lors de la quantification des pigments de la première expérience, il était possible de déterminer les teneurs en pigments produits par *Sphaerocystis sp.* dans les trois milieux comparés à la fin de la phase rouge (Figure 59).

Les résultats indiquent que le milieu BNH4 a permis d'obtenir des taux plus élevés pour tous les pigments quantifiés, à l'exception de la lutéine (0,6 mg/g). Cette dernière est plus présente en B3N (environ 1 mg/g). Les taux d'astaxanthine obtenus avec le milieu BNH4 varient entre 0,17 et 0,62 mg/g, soit une moyenne de 0,40 mg/g. Ces résultats sont proches de ceux obtenus par T. Leya en 2009 (0,36 mg/g), bien que les conditions opératoires soient différentes. La teneur en canthaxanthine a été plus importante que celle de l'astaxanthine sur tous les milieux, entre 0,8 et 1,15 mg/g avec un grand écart type.

Lors de la comparaison des teneurs entre le BNH4 de la première expérience et de la deuxième expérience, qui présentait une phase rouge 3,6 fois plus longue, un volume initial double et une quantité d'azote initial triplée, il n'a pas été observé d'augmentation significative des caroténoïdes secondaires (**Figure 60**).

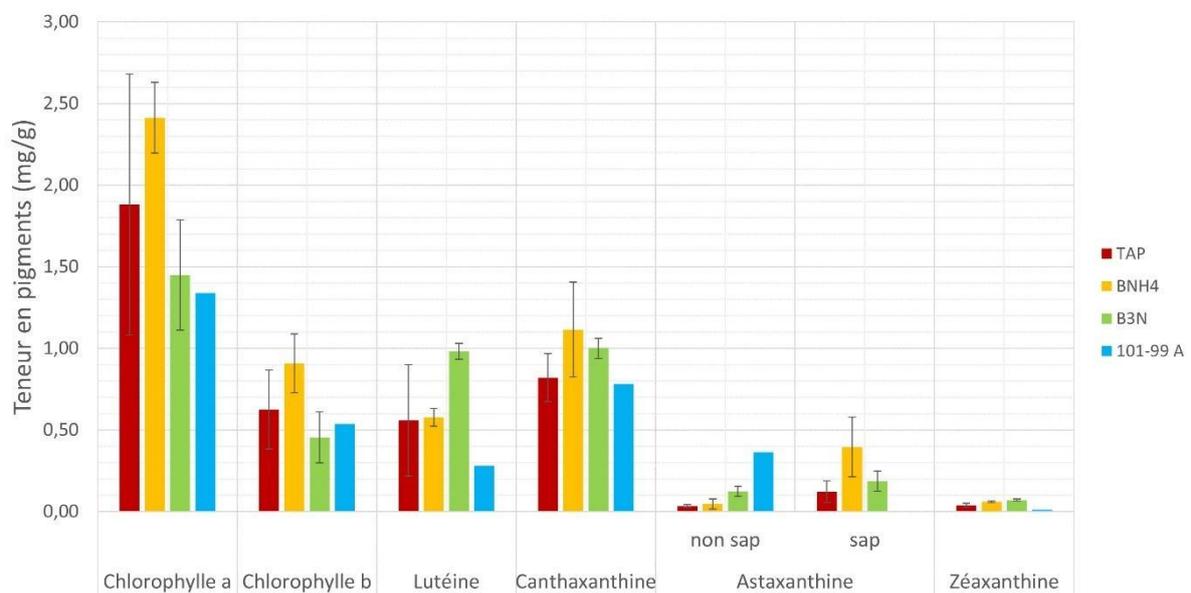


Figure 59 : Teneurs en pigments à la fin de la phase rouge avec *Sphaerocystis* sp. en TAP, BNH4 et B3N comparés aux résultats de T. Leya sur une souche similaire CCCryo 101-99.

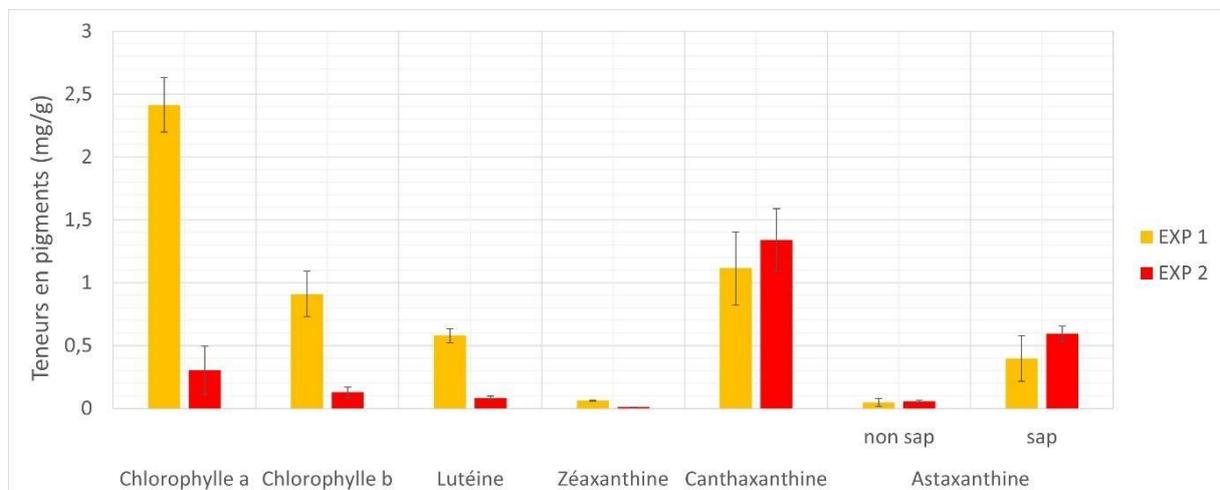


Figure 60 : Teneur en pigments obtenues à la fin de la phase rouge des cultures de *Sphaerocystis* sp. en milieu BNH4 comparant la première et la deuxième expérience.

La concentration de canthaxanthine est passée de 1,15 à 1,47 mg/g et celle de l'astaxanthine de 0,40 à 0,59 mg/g, avec de grandes variations entre les triplicatas. Il est constaté que *Sphaerocystis sp.* accumule naturellement une grande quantité de canthaxanthine, mais ne la transforme pas nécessairement en astaxanthine.

Par ailleurs, une culture prolongée entraîne la dégradation des chlorophylles a et b et de la lutéine. En effet, une baisse significative des chlorophylles a et b et de la lutéine a été observée entre la première et la deuxième expérience, passant respectivement de 2,41 ; 0,91 et 0,59 mg/g à 0,30 ; 0,13 et 0,10 mg/g. Cette dégradation est supposée être due à une carence plus longue.

Pour la montée en échelle, le milieu TAP n'a pas été retenu en raison de la variabilité importante des résultats entre les répliques. De plus, lors de la phase rouge, les cultures n'ont pas survécu. En outre, la présence d'acétate dans le milieu TAP constitue une source de carbone organique qui pourrait entraîner des contaminations bactériennes. Par ailleurs, bien que le milieu BNH4 a donné des résultats prometteurs pendant la phase rouge, les ajustements fréquents du pH ont conduit à son élimination comme choix possible. Le milieu de culture sélectionné a donc été le B3N pour la montée en échelle et le suivi des deux phases en photo-bioréacteur.

4.3 Étude de la phase rouge à l'échelle du photo-bioréacteur

4.3.1 Méthode de production de biomasse

Suite à la sélection d'un milieu plus adapté pour la culture de *Sphaerocystis sp.* lors des deux phases de culture, l'augmentation d'échelle a été initialement réalisée dans le milieu de culture B3N, en utilisant d'abord des Erlenmeyers de 250 mL, puis de 1 L dans le photo-incubateur.

Au cours des huit premiers jours de culture en PBR, le volume a été progressivement augmenté en fonction de la densité optique, passant de 2,5 L initialement à 5 L, la capacité souhaitée. La réalimentation du PBR était réalisée avec les solutions stock A, N, et P en évitant les carences (**Tableau 8**). Des microéléments et des vitamines ont aussi été ajoutés à l'état initial et après 26 jours de culture.

La culture en phase verte a été suivie pendant 48 jours, puis 40 jours en phase rouge. La phase rouge a été initiée par carence naturelle en azote et induction d'une plus forte luminosité avec un panneau de LED entourant le PBR, et ajoutant 150 à 250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ en plus des néons déjà présents en phase verte. La culture étant trop dense pour être stressée avec la lumière disponible, un litre a été retiré le premier jour de la phase rouge, et remplacé par 2 L d'eau stérile atteignant ainsi la capacité maximale de 6 L du PBR.

4.3.1.1 Suivi de la production de biomasse

Le taux de croissance après la première alimentation a été établi à $0,11 \text{ jour}^{-1}$, soit deux fois inférieur au taux de $0,23 \text{ jour}^{-1}$ observé lors de la comparaison entre les trois milieux de culture (TAP, BNH4 et B3N) dans les Erlenmeyers pour la même souche en B3N. Cette différence pourrait être attribuée à une meilleure disponibilité de la lumière dans l'incubateur, tandis qu'en PBR, les cellules ont tendance à avoir un accès limité à cette lumière.

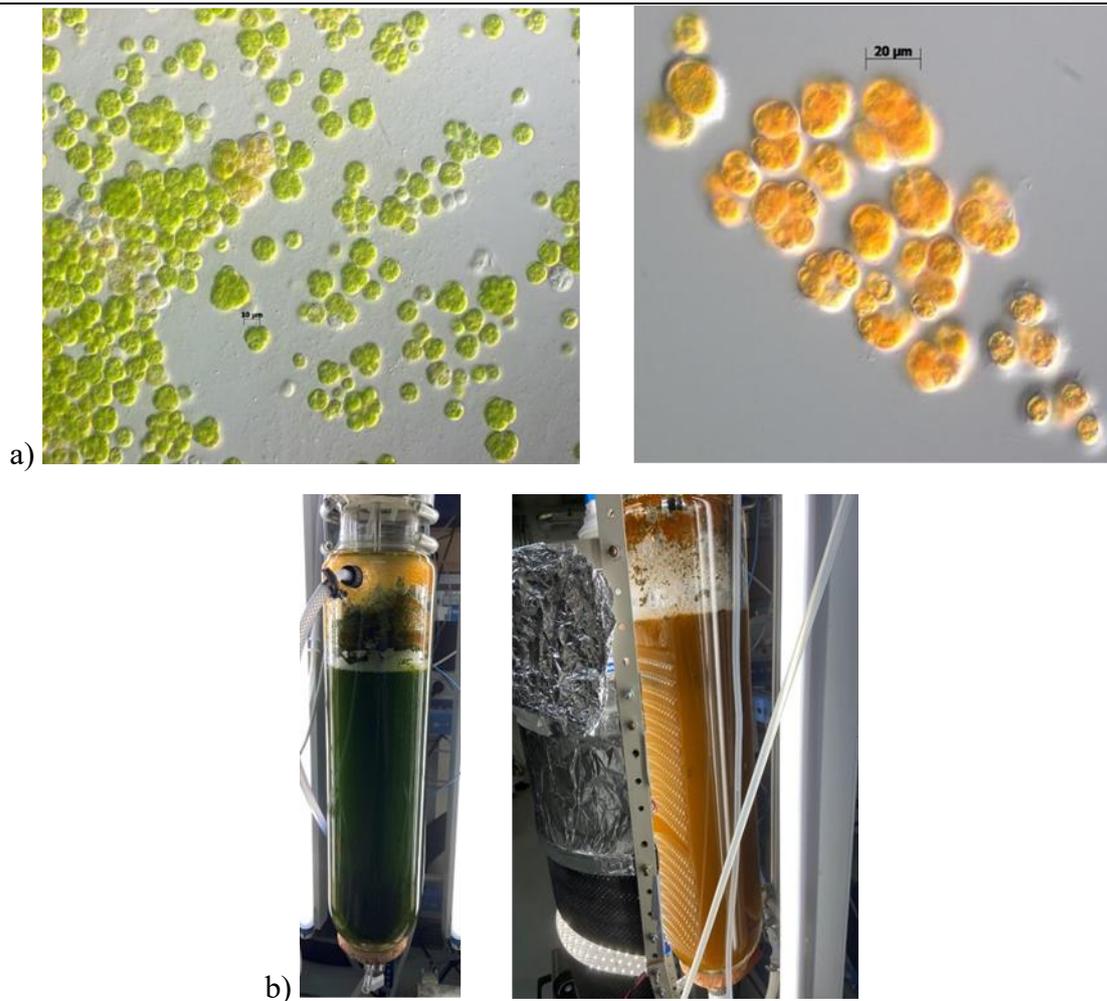


Figure 61 : Photographe du photo-bioréacteur de la culture de *Sphaerocystis sp.*, ainsi que l'observation des cellules au microscope optique (X400) au début du stress (photo à gauche), et à la fin du stress (photo à droite).

De plus, le développement de la microalgue dans le PBR a été accompagné par la formation de biofilms, qui ne sont pas formés dans les Erlenmeyers. Ces biofilms ne sont pas comptabilisés dans les résultats de DO, ce qui sous-estime le taux de croissance en PBR. De plus, ces biofilms qui se font sur les parois, peuvent gêner la transmission de la lumière au sein du PBR.

Les photos illustrant l'état de la culture dans le PBR, ont été prises au début et à la fin du stress en montrant la transition visuelle du vert à l'orange de la culture. Les cellules vertes, dont le diamètre varie de 5 à 10 μm, se sont agrégées entre elles au début du stress pour former des kystes oranges d'environ 18 à 20 μm de diamètre (voir la **Figure 61**).

La vitesse de consommation de nitrate, calculée entre chaque réalimentation durant la phase verte, oscillait entre 18 et 24,8 mg/L/jour (voir **Figure 63**).

Ensuite, un plateau de croissance de *Sphaerocystis sp.* a été atteint avec une DO proche de 0,84 en 48^{ème} jour, en présence d'une concentration très faible en nitrate (30 mg/L). À ce stade de limitation progressive, la phase rouge a été déclenchée par l'addition d'un panneau de LED pour une durée de 40 jours.

Pendant la phase rouge, une évolution rapide de la matière sèche par rapport à la DO est remarquée, passant de 1,14 g/L au 50^{ème} jour à 3,44 g/L au 88^{ème} jour (**Figure 62**). Cela est expliqué par une augmentation de la taille des cellules, due à l'accumulation des lipides et des caroténoïdes secondaires dans leur espace cytoplasmique. Aussi, la densité cellulaire notable de la culture dans le PBR pourrait provoquer le phénomène de l'auto-ombrage. Cela pourrait être la raison pour laquelle le passage du vert vers l'orange a duré 44 jours, car les cellules avaient très peu d'accès à la lumière.

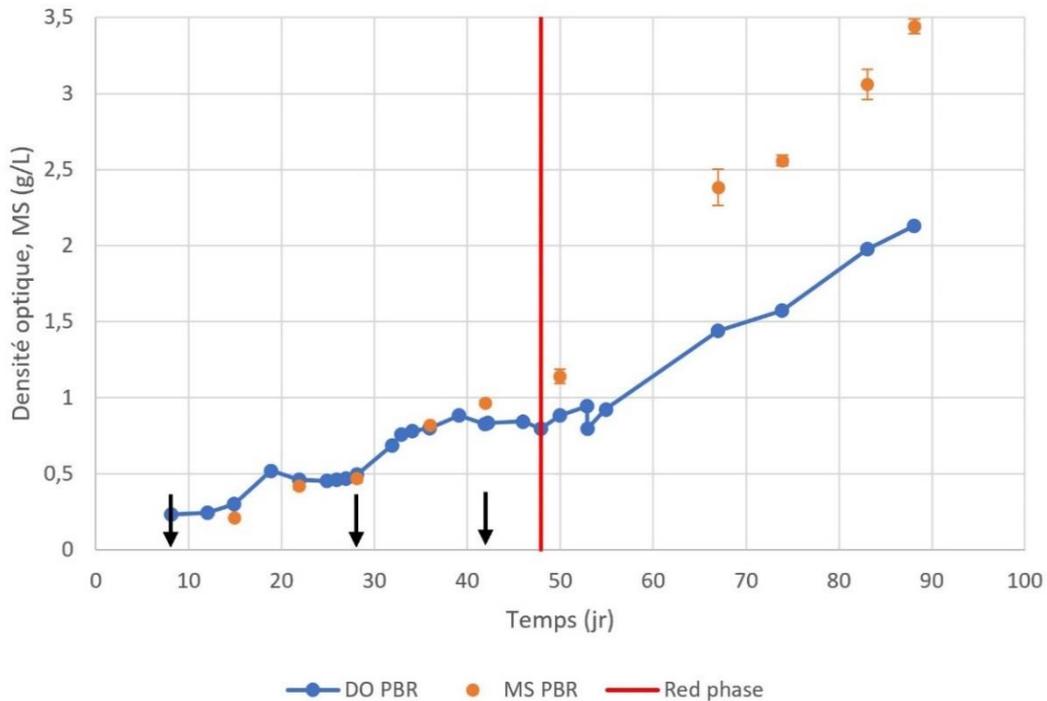


Figure 62 : Suivi de la croissance de *Sphaerocystis* sp. dans le milieu BBM en PBR pendant 88 jours, par la DO à 800 nm et la MS. Les flèches noires indiquent les réalimentations. Les barres d'erreur des MS indiquent les écarts types entre triplicatas.

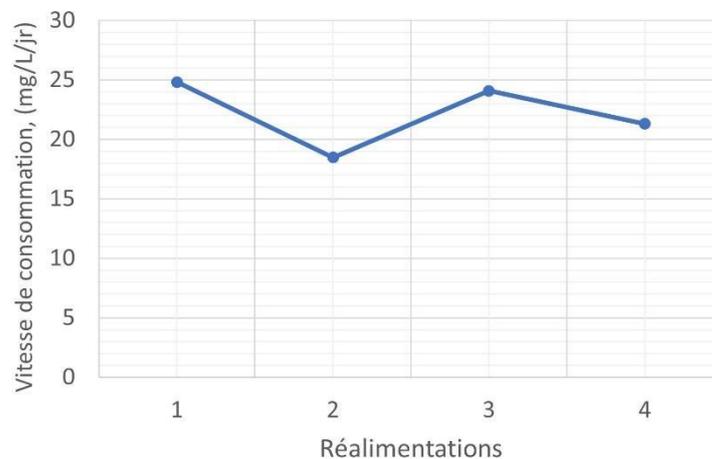


Figure 63 : Vitesse de consommation en nitrate calculée entre chaque réalimentation au cours de la culture en PBR de *Sphaerocystis* sp. en BBM en mode Fed Batch.

4.3.1.2 Suivi de la production de caroténoïdes

Le dosage des pigments a été réalisé du 22^{ème} au 88^{ème} jour, avec des prélèvements effectués chaque semaine. Les premiers échantillons avaient des matières sèches trop faibles pour être analysés, c'est pourquoi la quantification des pigments n'a commencé qu'à partir du 22^{ème} jour. Les résultats de dosage des pigments par la méthode HPLC sont montrés dans la **Figure 64**.

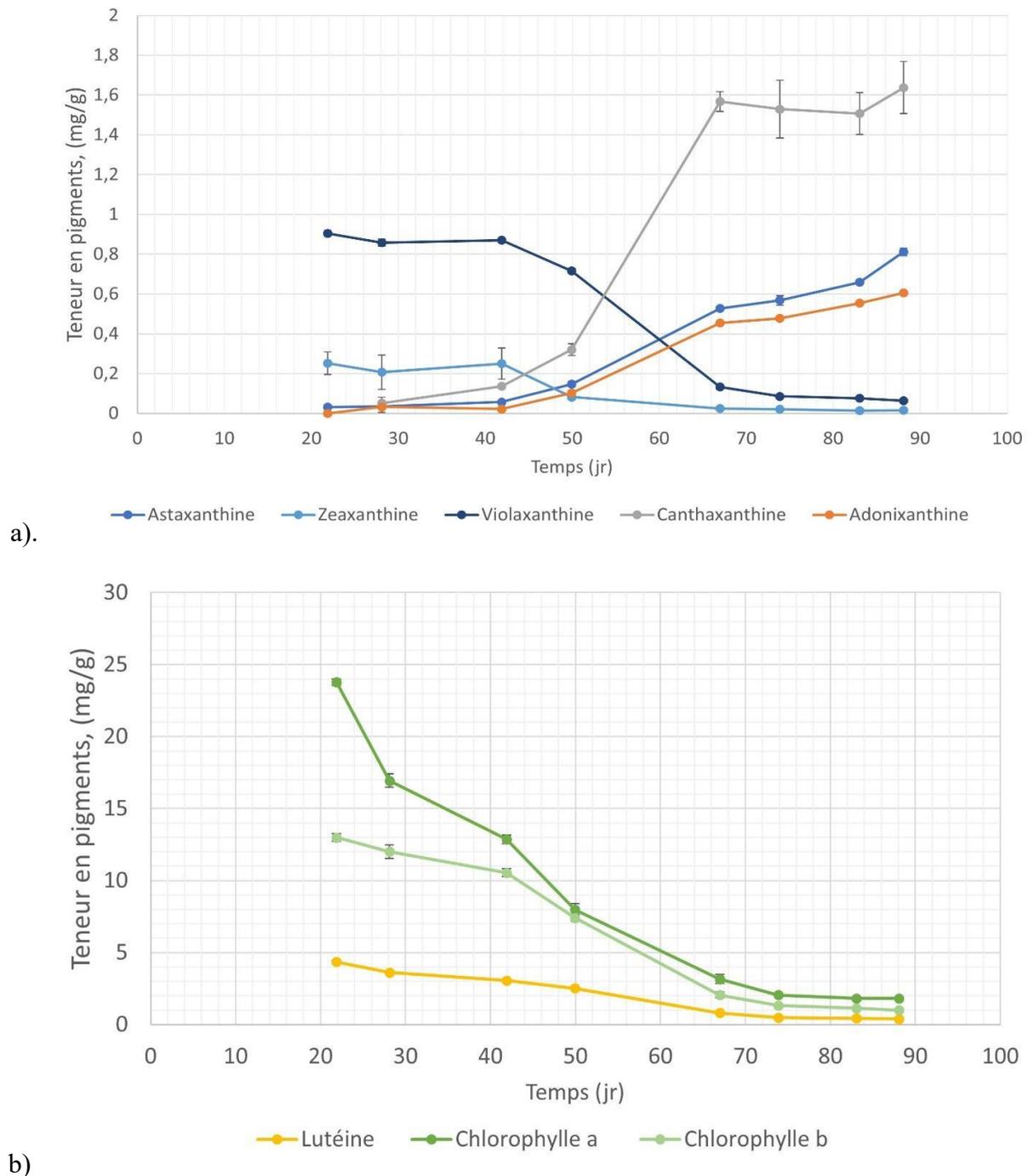


Figure 64 : Suivi des teneurs en pigments produit par *Sphaerocystis* sp., dosés par la méthode HPLC-UV dans le PBR pendant 88 jours. a) caroténoïdes secondaires. b) chlorophylles et lutéine. Les barres d'erreur des MS indiquent les écarts types entre triplicatas.

D'après le suivi des caroténoïdes, deux tendances cinétiques ont été observées au fil du temps : une de dégradation et une de production. La cinétique de dégradation concerne les trois caroténoïdes primaires, -lutéine, violaxanthine et zéaxanthine- qui a suivi celle des chlorophylles a et b. La microalgue *Sphaerocystis sp.* semble être particulièrement riche en lutéine en dehors des périodes de stress (75-80% des caroténoïdes totaux). Sa teneur a été de 4,36 mg/g MS le 22^{ème} jour pendant la phase verte, avant de diminuer d'environ 90% à la fin de la phase rouge.

Les teneurs de violaxanthine et de zéaxanthine sont restées stables jusqu'à la fin de la phase verte (0,9 et 0,25 mg/g MS respectivement) avant de chuter en dessous d'environ 90% après la phase rouge. Pareillement, les chlorophylles ont significativement diminué à plus de 90% de leur teneur initiale au fil du temps.

La teneur en caroténoïdes totaux, si on déduit la teneur en lutéine, a augmenté significativement durant la phase rouge. Elle correspond à la production de trois caroténoïdes secondaires, la canthaxanthine, l'astaxanthine et l'adonixanthine, recherchés dans cette expérience. Celle-ci a ainsi doublé en passant de 1,19 mg/g MS en phase verte à 3,13 mg/g MS à la fin de la phase rouge (**Figure 65**).

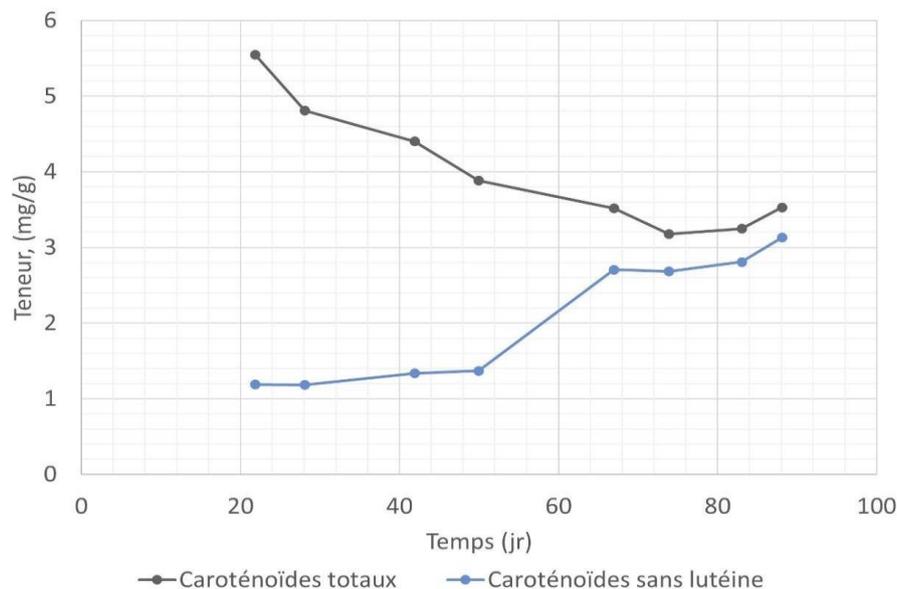


Figure 65 : Suivi des teneurs en caroténoïdes produit par *Sphaerocystis sp.*, dosés par la méthode HPLC-UV dans le PBR pendant 88 jours.

Sphaerocystis sp. a produit environ deux fois plus de canthaxanthine que d'astaxanthine (1,63 contre 0,81 mg/g MS), ainsi que 0,6 mg/g MS d'adonixanthine. Ces valeurs sont proches de celles obtenues précédemment à l'échelle de l'Erlenmeyers dans 100 mL de milieu BNH4 après 25 jours de stress sous carence naturelle en azote combiné à un stress lumineux. La teneur en canthaxanthine était de 1,47 mg/g et celle en astaxanthine de 0,59 mg/g, bien que ces dernières aient été obtenues avec de grands écarts types. Cela est cohérent avec l'observation microscopique des cellules qui présentent une pigmentation plutôt orange que rouge, due à la canthaxanthine.

La présence des deux caroténoïdes, la canthaxanthine et l'adonixanthine, suggère que la voie de biosynthèse de l'astaxanthine pourrait être dérivée du bêta-carotène via ces deux intermédiaires. La conversion du bêta-carotène en canthaxanthine ou en adonixanthine est en effet une réaction plus rapide. Cependant, étant donné que l'adonixanthine est présente en faible quantité, la biosynthèse de l'astaxanthine semble difficile. Cette observation a été faite sur la microalgue verte de *Chlorococcum* par Yuan et al., (2002), qui ont suggéré que l'astaxanthine était synthétisée à partir de bêta-carotène via l'échinonone, la canthaxanthine et l'adonirubine.

Comme illustré sur la **Figure 65**, la teneur en canthaxanthine a atteint un plateau à environ 1,6 mg/g de matière sèche. De plus, il est probable que la teneur en astaxanthine aurait continué à augmenter, au-delà de 0,8 mg/g si la période de culture avait été prolongée.

5 Comparaison de la culture des deux souches en photo-bioréacteur

5.1 Production de caroténoïdes

Le **Tableau 18** permet de comparer la diversité de pigments produits par les deux souches psychrophiles, cultivées à l'échelle de photo-bioréacteur en phase rouge.

Tableau 18 : Teneurs en pigments de *Sphaerocystis sp.* (*S.sp*) et de *Pleurastrum sp.* (*P.sp*) en phase rouge, provenant de la culture en PBRs. (-). Les écarts-types indiqués sont basés sur des mesures effectuées en triplicatas.

Pigment (mg/g MS)	<i>S.sp</i>	<i>P.sp</i>
Astaxanthine	0,81±0,02	non-déecté
Lutéine	0,40±0,02	3,40±0,29
Zéaxanthine	0,02±0,00	0,26±0,02
Violaxanthine	0,06±0,00	0,43±0,03
Adonixanthine	0,60±0,01	1,30±0,07
Canthaxanthine	1,64±0,13	1,62±0,10
Chlorophylle a	1,82±0,09	21,52±1,36
Chlorophylle b	1,00±0,04	7,77±0,59
Caroténoïdes totaux	3,53	7,02
Caroténoïdes secondaires	3,05	2,92

Pour *Sphaerocystis sp.* les caroténoïdes secondaires constituent 86,4% des caroténoïdes totaux quantifiés en fin de la phase rouge. En revanche, dans le cas de *Pleurastrum sp.* dans le PBR2, les caroténoïdes secondaires ne représentent que 41,6% des caroténoïdes totaux, avec une grande quantité de lutéine (48%).

La présence de chlorophylle a et de zéaxanthine est 12-13 fois supérieure, et celle de chlorophylle b et de violaxanthine est 7-8 supérieure à celles trouvées dégradées chez *Sphaerocystis sp.* Cela est attribué au fait que la phase rouge n'a pas été complètement installée.

Néanmoins, les deux souches produisent une teneur élevée et similaire en canthaxanthine, principal caroténoïde secondaire (1,63 mg/g MS). La souche *Pleurastrum sp.* a présenté une teneur plus élevée en adonixanthine de 1,3 mg/g contre seulement 0,6 mg/g chez *Sphaerocystis sp.* cette dernière a produit 0,8 mg/g MS d'astaxanthine, tandis que chez *Pleurastrum sp.* ce pigment n'a pas été détecté sur le chromatogramme, probablement faute de saponification.

La présence de la canthaxanthine et de l'adonixanthine chez les deux souches suggère que la conversion de ces caroténoïdes en astaxanthine nécessite plus du temps. Cela pourrait indiquer que le processus biochimique impliqué dans la transformation de ces caroténoïdes n'est pas encore achevé. Malgré leurs teneurs faibles, les deux souches sont plutôt productrices de canthaxanthine, d'adonixanthine et de lutéine en grande quantité que d'astaxanthine. Ces trois caroténoïdes ont également des propriétés antioxydantes d'intérêt commercial en pharmaceutique et alimentaire, tels que décrit dans le **chapitre I**.

5.2 Production d'acides gras

Chaque acide gras présenté sur l'axe des abscisses a été quantifié dans au moins une des quatre conditions. Cependant, leur concentration peut parfois être trop faible pour être perceptible sur le graphique. Seuls les acides gras que nous avons pu quantifier précisément sont représentés.

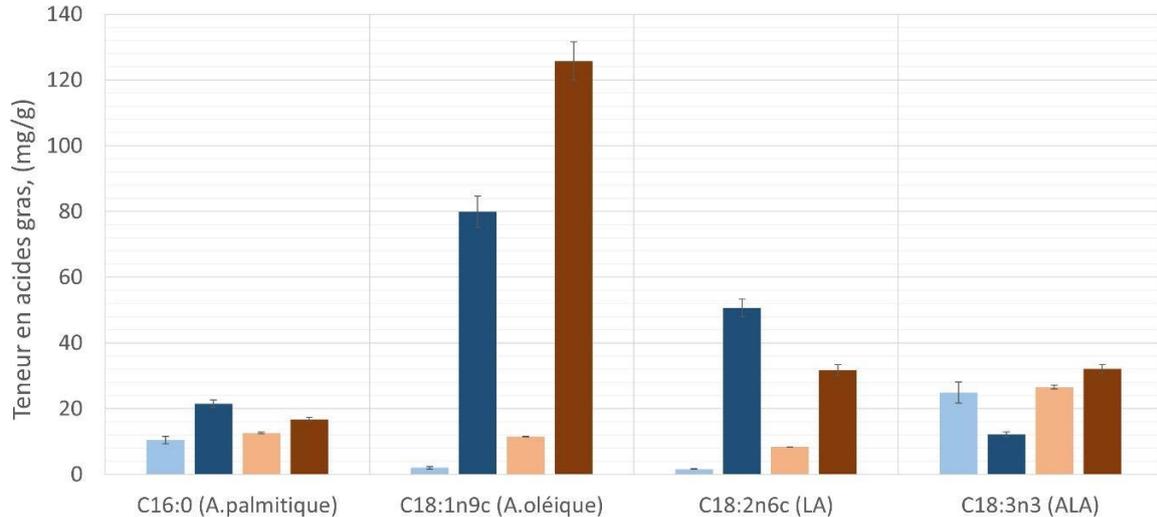


Figure 66 : Teneurs en acide gras de la culture de *Pleurastrum sp.* à la fin de la phase verte (●) et rouge (●) et de la culture de *Sphaerocystis sp.* à la fin de la phase verte (●) et rouge (●).

Les acides gras les plus retrouvés dans les quatre conditions sont l'acide palmitique (C16:0), l'acide oléique (C18:1n9c), l'acide linoléique LA (C18:2n6c), et l'acide α -linoléique ALA (C18:3n3). Les trois acides gras insaturés sont les précurseurs les plus fréquemment rencontrés dans la formation des omégas 3, 6, et 9 (Certik & Shimizu, 1999). En outre, ces acides gras sont également produits par *H.pluvialis* dans des conditions de stress, en plus de l'acide stéarique qui n'a pas été retrouvé chez les deux souches étudiées (Lei et al., 2012).

Pour les deux microalgues psychrophiles, il y a eu une augmentation notable de la teneur en deux acides gras insaturés, l'acide oléique et l'acide linoléique, lors de la phase rouge. L'acide oléique est produit en grande quantité lors de la phase rouge chez *Pleurastrum sp.* (125 mg/g MS) et *Sphaerocystis sp.* (80 mg/g), avec des augmentations respectives de 40 et 11 fois leur teneur en phase verte. L'acide linoléique (LA) est le deuxième acide gras produit en abondance, avec une augmentation de 32 et 4 fois par rapport à la phase verte chez *Pleurastrum sp.* et *Sphaerocystis sp.* respectivement. En ce qui concerne l'acide α -linoléique ALA, sa teneur a diminué lors de la phase rouge chez *Pleurastrum sp.*, bien qu'il reste toujours en quantité importante. En revanche, la teneur chez *Sphaerocystis sp.* est restée relativement stable avec une légère augmentation observée lors de la phase rouge.

D'autres acides gras, non quantifiés par la méthode GC, ont été déterminés de manière qualitative par le logiciel. En effet, il n'existait pas de standard pour ces acides qui permettrait de relier l'aire d'un pic à une concentration spécifique. De ce fait, le tableau ci-dessous répertorie ces acides gras trouvés chez les deux souches psychrophiles.

Tableau 19 : Liste des acides gras déterminés de manière qualitative par la méthode GC chez les deux souches psychrophiles.

Acide gras non quantifiés par la méthode GC	
Saturés	Insaturés
C14:0	C17:1
C15:0	C18:3n6
C17:0	C20:1
C18:0	C20:2
C20:0	C20:3n3
C24:0	C12:1n9

Le profil général des acides gras, déterminé chez les deux souches psychrophiles, semble comparable à celui trouvé chez la microalgue *C.zofingiensis* et *H.pluvialis* (Zhu et al., 2015). Ces dernières ont été largement étudiées pour la corrélation entre leur production de lipides et d'astaxanthine dans des conditions de stress spécifiques. Cette comparaison renforce la relation établie entre l'accumulation de caroténoïdes secondaires, notamment l'astaxanthine et la synthèse d'acide gras impliqués dans son estérification. En effet, l'accumulation d'astaxanthine nécessite une synthèse active d'acide gras et elle est corrélée à la production, en particulier, de l'acide oléique. Ce dernier est spécifiquement utilisé par *H.pluvialis* pour produire de l'astaxanthine mono-estérifiée, qui est la forme la plus abondante. Cette observation est en cohérence avec les publications sur le sujet de l'augmentation de la teneur en lipides en phase rouge (Mulders et al., 2014). Elle est également en accord avec l'étude révélant que seulement 5% de l'astaxanthine est présente sous forme libre, tandis que 48% est sous forme estérifiée dans le total des caroténoïdes produits par les microalgues du permafrost (Leya, 2020).

6 Conclusion

Cette section s'est attachée à la culture des souches psychrophiles *Sphaerocystis sp.* et *Pleurastrum sp.* pour caractériser leur production de caroténoïdes secondaires, notamment la canthaxanthine et l'astaxanthine.

Nos résultats suggèrent que *Sphaerocystis sp.* est la souche la plus facile à cultiver (culture en suspension) et surtout à stresser sur les deux échelles, erlenmeyers et photo-bioréacteur. Bien qu'elle possède le meilleur profil en termes de caroténoïdes totaux, sa faible teneur en astaxanthine par rapport aux caroténoïdes totaux ne fait pas de cette souche une candidate très intéressante pour ce pigment. Cependant, elle reste intéressante en raison de sa production de canthaxanthine, 2 à 4,3 fois plus élevée que celle d'astaxanthine suivant les expériences. La phase rouge a été induite grâce à une carence naturelle en azote et une augmentation l'intensité lumineuse, en suivant une approche en une seule étape. En effet, une production facilitée par une culture en une seule étape permet d'obtenir une meilleure productivité, de minimiser les contaminations, rendant ainsi la production de caroténoïdes plus fiable.

Pleurastrum sp. était plus difficile à stresser, car elle a eu la particularité de se développer sous formes de flocons. Cela a favorisé la sédimentation de la culture et la formation de biofilms dans le photobioréacteur. En outre, la production des caroténoïdes a été effectuée de manière discontinue en deux étapes, en substituant le milieu de culture de croissance à la fin de la phase verte, par un autre milieu déficient, et en induisant le stress par une augmentation de l'intensité lumineuse. Cela a rendu également difficile la maîtrise de la forme cellulaire, qui était un facteur déterminant pour l'induction de la synthèse des caroténoïdes. Néanmoins, cette souche de *Pleurastrum sp.* était également capable de produire la canthaxanthine, représentant en moyenne 70% des caroténoïdes totaux en erlenmeyer, soit 4-5 mg/g MS. C'est nettement plus que la moyenne de 54% observée pour *Sphaerocystis sp.* De plus, *Pleurastrum sp.* présente également une richesse en lutéine et en adonixanthine, qui représentent respectivement 21-50% et 22,7% des caroténoïdes totaux, soit 1,3 et 3,4 mg/g MS, suivant les expériences.

En outre, les résultats suggèrent que la voie de conversion d'astaxanthine dérive du bêta-carotène impliquant sa conversion en canthaxanthine et en adonixanthine. Cette étape est considérée comme une réaction plus rapide, comparativement à la conversion de la canthaxanthine ou de l'adonixanthine en astaxanthine (Yuan et al., 2002).

La canthaxanthine, l'adonixanthine et la lutéine, bien qu'en faibles quantités, sont aussi des molécules à haute valeur ajoutée, qui pourraient être valorisables. Par ailleurs, l'acide oléique et l'acide linoléique, pourraient également ouvrir des opportunités de valorisation. Néanmoins, il convient de souligner que des recherches supplémentaires seraient nécessaires pour déterminer la faisabilité et la rentabilité d'un tel procédé de valorisation de ces molécules.

D'après les résultats présentés, *Sphaerocystis sp.* semble présenter un potentiel similaire à celui de *H. pluvialis* pour une optimisation future de la production de biomasse et des caroténoïdes en une seule étape en photobioréacteur. Pour cela, il pourrait être intéressant de cultiver *Sphaerocystis sp.* en B3N dans un PBR, car son taux de croissance était plus élevé

Il serait également préférable de passer plus rapidement en phase rouge, c'est-à-dire dès que la culture atteint une concentration de 50 mg/L de nitrate, sans réalimentation, pour éviter une densification excessive de la culture et donc une dilution nécessaire. Cela permettrait un passage plus rapide à la phase rouge. Ce passage pourrait se faire par carence naturelle, puisqu'à échelle industrielle, il est plus difficile de vider un milieu de culture pour le substituer par un milieu carencé. De plus, la réduction du nombre d'étapes limite les risques de contamination. Il faudrait également une plus forte luminosité, dont l'intensité reste à déterminer, mais elle devrait être au minimum supérieure à 300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. L'ajout de sel, connu pour provoquer un stress oxydatif, pourrait également être utile pour la souche *Sphaerocystis sp.*, mais cela reste à confirmer par des recherches supplémentaires. Aussi, le type de photo-bioréacteur air-lift serait approprié pour cette application permettant d'obtenir une meilleure productivité pendant la culture.

En s'inspirant des travaux sur l'amélioration de la teneur en astaxanthine chez *H. pluvialis*, il serait également intéressant d'explorer la culture de la souche *Sphaerocystis sp.* en conditions hétérotrophes et/ou en mixotrophes. De nombreuses études menées sur *H. pluvialis* ont montré des résultats significatifs en termes d'amélioration de la teneur en astaxanthine, en utilisant différentes sources de carbone organique, à diverses concentrations. Cette approche pourrait potentiellement améliorer la croissance et la productivité d'astaxanthine chez *Sphaerocystis sp.*

En guise de conclusion, il serait envisageable de poursuivre des recherches plus approfondies afin d'optimiser la chaîne de procédés de production des caroténoïdes à partir des souches psychrophiles. En réalité, un effort d'optimisation est encore nécessaire pour permettre d'évaluer la viabilité, la faisabilité et la rentabilité d'un procédé de production à grande échelle en extérieur pour l'une de ces souches psychrophiles.

Chapitre 3 : Résultats et discussions

Section 3 : Comparaison de méthodes de prétraitement pour améliorer l'extraction des caroténoïdes à partir de microalgues

1 Introduction

L'objectif principal de cette section est d'évaluer l'efficacité de l'extraction des caroténoïdes à partir de deux souches psychrophiles, *Sphaerocystis sp.* et *Pleurastrum sp.*, et de les comparer à la souche de référence *Haematococcus pluvialis*. Nous nous concentrons dans cette étude sur la quantification des caroténoïdes totaux et l'évaluation du rendement d'extraction en utilisant diverses méthodes de traitement appliquées aux biomasses rouges.

Plusieurs méthodes d'extraction sont explorées, y compris des méthodes mécaniques et physiques, telles que le broyage à bille, les ultrasons et les champs électriques pulsés. Ces techniques seront utilisées et nous mettrons en évidence leur effet sur l'extraction des caroténoïdes produits par les souches psychrophiles. Celles-ci possèdent, en effet, une paroi cellulaire plus ou moins épaisse que nous estimons entre 0,3 à 0,4 μm en nous référant à l'espèce de *Chlamydomonas nivalis* décrite en chapitre bibliographique. Cette épaisseur est un facteur qui peut présenter des défis pour l'extraction efficace des caroténoïdes.

Nous chercherons à déterminer quelle méthode ou combinaison de méthodes offre le meilleur rendement d'extraction. Cela pourrait nous aider à comprendre comment optimiser le processus d'extraction pour ces types spécifiques de microalgues. Par exemple, si une souche a une paroi cellulaire particulièrement épaisse, une méthode de prétraitement plus agressive peut être nécessaire. À cette fin, nous comparerons les résultats obtenus avec *Sphaerocystis sp.* et *Pleurastrum sp.* à ceux obtenus avec la souche de référence *H.pluvialis*. Cela nous permettra de déterminer si ces souches psychrophiles offrent des avantages potentiels en termes de rendement d'extraction des caroténoïdes.

Cette recherche pourrait avoir des implications importantes pour l'industrie des biotechnologies, en particulier pour la production de caroténoïdes à partir des microalgues psychrophiles sélectionnées. Elle revêt une importance particulière pour comprendre le comportement des deux souches psychrophiles en termes de production de caroténoïdes et de réponse aux méthodes de rupture cellulaire.

2 Méthodologie générale

La méthodologie générale suivie vise à étudier l'effet des différents traitements appliqués sur l'extraction finale des caroténoïdes.

2.1 Préparation de la biomasse

Pour réduire la conductivité liée au milieu de culture et éliminer les pigments résiduels, un lavage initial de la biomasse humide avec de l'eau pure a été effectué avant chaque traitement.

Cette étape permet également d'éliminer les cellules mortes, empêchant ainsi leur relargage potentiel de pigments et d'autres composés intracellulaires. De cette manière, le prétraitement est réalisé sur les cellules qui sont restées intactes.

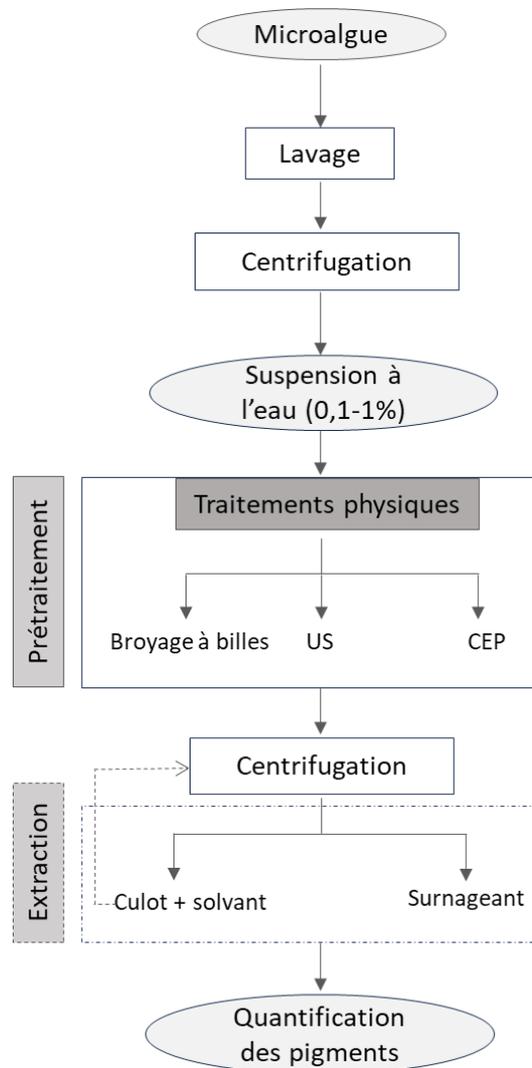


Figure 67 : Schéma général des étapes expérimentales

2.2 Méthodes d'extraction

La représentation schématique des étapes suivies est illustrée dans la **Figure 67**. Les détails de chaque méthode de prétraitement sont décrits dans le chapitre « Matériels et méthodes ». Il en va de même en ce qui concerne l'extraction par solvant. Pour les deux prétraitements par US et par CEP, l'énergie spécifique a été calculée selon les équations suivantes :

$$\text{Pour l'US : } E = P \times \frac{t}{m}$$

$$\text{Pour les CEP : } E = W_i \times \frac{n}{m}$$

où E est l'énergie spécifique en kJ/kg, P est la puissance en Watt, t est le temps en secondes, m est la masse de la suspension microalgale en kg, W_i est l'énergie d'impulsion en kJ/pulse et n est le nombre d'impulsions.

2.3 Méthodes d'analyse des pigments

La quantification des pigments est effectuée en utilisant deux méthodes : la spectrophotométrie et l'HPLC-UV. La séparation des caroténoïdes est réalisée à l'aide des méthodes CCM et HPTLC. L'ensemble de ces méthodes est détaillé dans le chapitre « Matériels et méthodes ». Le rendement R en % est calculé selon l'équation suivante :

$$R (\%) = \frac{T}{T_{max}} \times 100$$

Avec : T est la teneur en caroténoïdes en équivalent d'astaxanthine, et T_{max} est la teneur maximale trouvée par la méthode d'extraction assistée par le broyage à billes en utilisant de la biomasse lyophilisée.

3 Résultats de l'étude avec *Haematococcus pluvialis*

3.1 Effet du solvant d'extraction

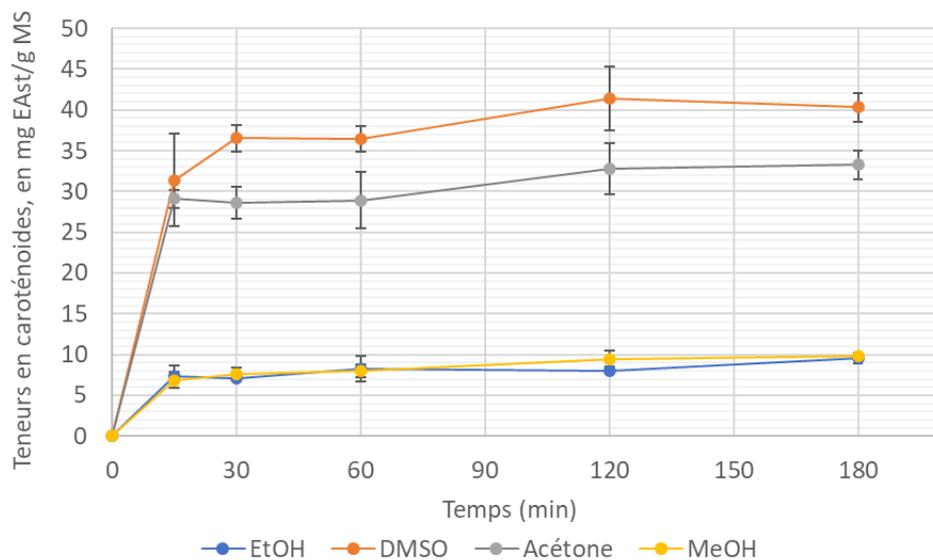
L'évaluation de l'effet du solvant sur le rendement d'extraction d'astaxanthine a montré que les rendements varient en fonction du solvant utilisé. L'ordre de l'efficacité est comme suit : diméthylesulfoxyde (DMSO) > acétone > méthanol (MeOH) > éthanol (EtOH), comme le montre la **Figure 68**.

Le DMSO et l'acétone se sont avérés être les solvants les plus efficaces. Après 3 heures d'extraction, les rendements obtenus étaient respectivement de 91% et 62%, ce qui correspond à 40,33 mg/g et 33,26 mg/g d'astaxanthine. Ces valeurs sont en accord avec la capacité connue de *H.pluvialis* à accumuler entre 40 à 70 mg d'astaxanthine par gramme de matière sèche (Boussiba, 2000; Liyanaarachchi et al., 2020). De plus, ces résultats sont relativement proches de ceux obtenus par Chen et al., 2022. Après 1 h d'extraction au solvant sous agitation, ils ont obtenu un rendement de 97,2% dans le DMSO et 65% dans l'acétone. En comparaison, le méthanol et l'éthanol ont été les moins efficaces, avec respectivement des rendements d'extraction de 25% et 18%.

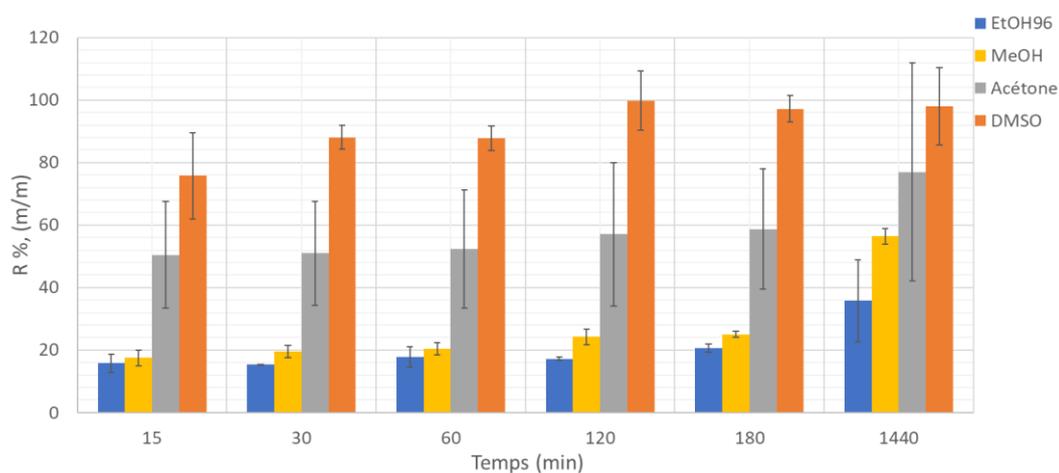
L'acétone est un solvant généralement reconnu comme sûr (GRAS) et le DMSO a une bonne perméabilité cellulaire. Le DMSO est parfois considéré comme un solvant vert en raison de sa non-toxicité et de sa recyclabilité (E. Camp et al., 2020). Ce solvant organique est largement reconnu pour sa capacité à faciliter l'extraction des chlorophylles et des caroténoïdes des microalgues, notamment l'astaxanthine d'*H.pluvialis* (Boussiba et al., 1992; Seely et al., 1972).

En combinaison avec l'acétone, il permet une extraction rapide et efficace de la chlorophylle et des caroténoïdes. Par exemple, S. Wang et al., (2018) ont réussi à extraire 6% (m/m MS) d'astaxanthine d'*H.pluvialis*. Cette efficacité est expliquée par la perméabilité cellulaire du DMSO, qui lui permet de pénétrer facilement dans les membranes cellulaires, facilitant ainsi l'extraction des pigments.

Dans le contexte de l'éco-extraction et du respect de l'environnement, l'acétone et l'éthanol se distinguent comme des substituts plus écologiques en comparaison au DMSO et au méthanol (Ranjan et al., 2010).



A)



B)

Figure 68 : Cinétique d'extraction des caroténoïdes en équivalent d'astaxanthine (A) et les rendements en % (B) en fonction du temps d'extraction et selon le solvant utilisé. Les barres d'erreur indiquent les écarts types entre les duplicatas.

3.2 Effet du temps d'extraction au solvant

L'effet du temps d'extraction sur le rendement en astaxanthine a été évalué pour chaque solvant utilisé. Pour tous les solvants, nous avons constaté une augmentation rapide du rendement d'extraction avec un équilibre atteint au bout de 30 min, comme illustré dans la **Figure 68**.

Le DMSO a permis d'atteindre la teneur la plus élevée, soit 36,54 mg/g, ce qui correspond à un rendement d'astaxanthine de 88%. En comparaison, un rendement de 51% a été atteint avec l'acétone, 19% avec le méthanol et 15% avec l'éthanol. Le rendement d'extraction augmente avec le temps jusqu'à atteindre un plateau, correspondant à un équilibre entre la concentration des constituants internes et externes des cellules végétales.

Une fois cet équilibre atteint, le rendement d'extraction ne peut plus augmenter, et il devient inutile d'augmenter le temps d'extraction (Zou et al., 2013). Une analyse de variance (ANOVA) indique que le rendement d'extraction n'est plus significativement différent après 30 min (valeur $p > 0,05$). Dans la suite du travail, on a donc considéré qu'une durée de 30 minutes était suffisante pour obtenir le rendement le plus élevé. Cependant, en utilisant le méthanol et l'éthanol, nous avons observé que les rendements ont augmenté après une extraction prolongée de 24 heures, sans toutefois dépasser 55%.

Par conséquent, pour accélérer et améliorer l'extraction de l'astaxanthine avec de l'éthanol, deux prétraitements physiques, à savoir les ultrasons et les champs électriques pulsés, ont été utilisés. Ces prétraitements ont pour but d'affaiblir les parois cellulaires rigides et électroporer les membranes cellulaires.

3.3 Effet de prétraitements physiques sur l'extraction

D'après la **Figure 70** (B), les ultrasons et les champs électriques pulsés, ont facilité la libération rapide des caroténoïdes, en équivalent d'astaxanthine. En effet, ils ont permis d'améliorer à la fois le rendement maximum et la cinétique d'extraction avec l'éthanol.

Suite à l'observation microscopique des kystes avant et après prétraitement physique, nous avons remarqué que les cellules rouges, qui étaient initialement intactes, ont été impactées et ont libérées leur contenu en caroténoïdes. Elles sont alors devenues parfois vertes claires à transparentes. Après avoir réalisé une extraction avec l'éthanol, la plupart des cellules se sont transformées en débris cellulaires, comme illustré dans la **Figure 69**.

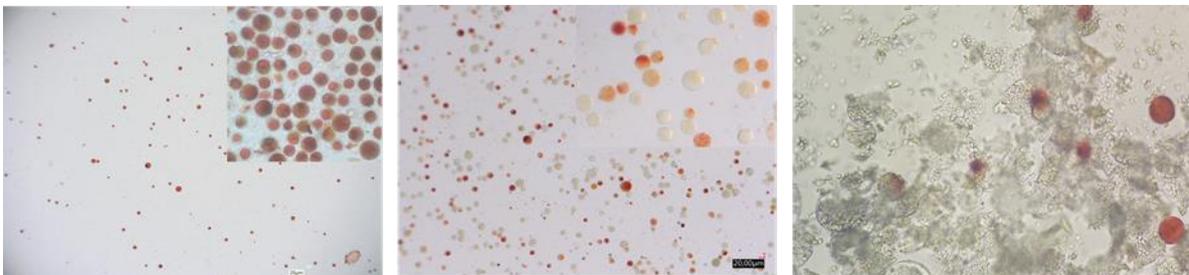
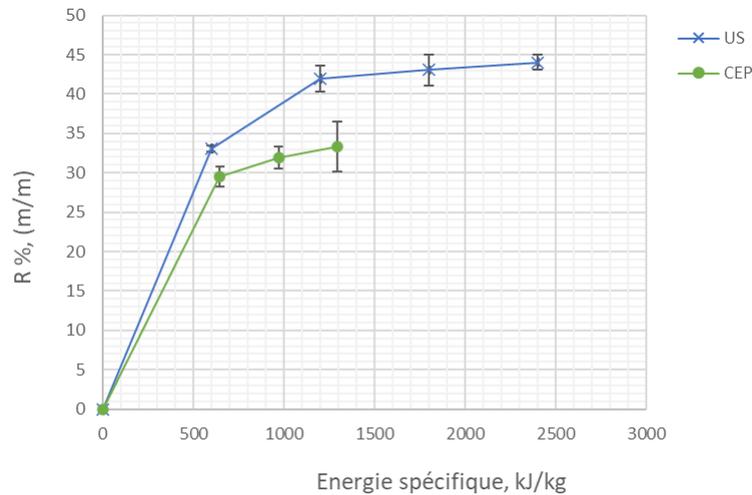


Figure 69 : Observations microscopiques au grossissement X1000 des kystes d'*H.phuvialis*, avant prétraitement (à gauche), après les prétraitements physiques (au milieu) et après l'extraction avec l'éthanol (à droite).

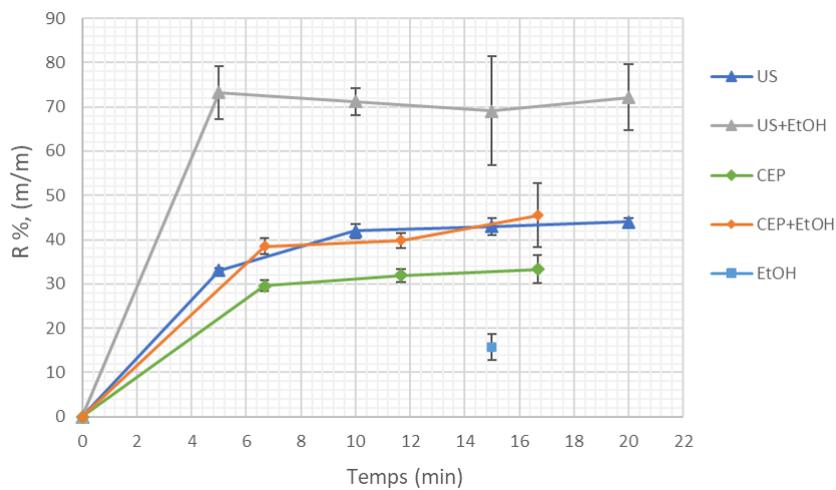
US et CEP, ont permis d'atteindre des rendements en caroténoïdes respectifs de 44% et 33%, à partir d'une énergie spécifique d'environ 1300 kJ/kg (**Figure 70** (A)). L'extraction à l'éthanol combiné au prétraitement US (**Figure 70** (B)) a permis d'atteindre le meilleur rendement (73%) en moins de 5 min.

En dépit de la paroi épaisse et rigide de *H.phuvialis* (1,8 à 2,2 μm), les ultrasons ont permis d'extraire jusqu'à 43% des caroténoïdes avant l'étape d'extraction. Cette efficacité est attribuée à l'augmentation de la perméabilité des membranes cellulaires, un phénomène induit par la cavitation acoustique. Cela permet ainsi d'améliorer le transfert de matière entre les cellules et le solvant.

En effet, la cavitation acoustique crée localement des différences extrêmes de température et de pression, ainsi que des forces de cisaillement élevées dans le milieu. Lorsque les bulles de cavitation implosent à la surface de solides (tels que des particules, des cellules végétales, des tissus, etc.), elles engendrent des effets tels que l'éclatement des particules, la sonoporation (la perforation des parois et des membranes cellulaires) et la dislocation des cellules (Achat, 2013).



A)



B)

Figure 70 : Effet du prétraitement US et CEP sur le rendement d'extraction des caroténoïdes R en %, (A) en fonction d'énergie spécifique en kJ/kg et (B) en fonction du temps en minutes.

On constate que la cinétique d'extraction est nettement accélérée par le traitement US ou CEP avec ou sans éthanol, puisque 5 à 10 min suffisent pour atteindre l'équilibre (30 à 45% de rendement, et même 73% avec US+EtOH). En comparaison, l'extraction dans l'éthanol sans prétraitement avait nécessité environ 24 h pour atteindre 40% de rendement.

Nous remarquons que l'extraction à l'éthanol après traitement CEP augmente peu le rendement (40-45% au lieu de 30-35%), contrairement après traitement US (70-75% au lieu de 40-45%). Le traitement par CEP est donc moins efficace que les US et semble conduire davantage à une fragilisation ou électroporation de la paroi, plutôt qu'à une rupture complète.

Dans la littérature (Martínez et al., 2019), le traitement par CEP a permis d'atteindre un rendement de 96%, mais il a été nécessaire de macérer la biomasse prétraitée pendant 6 h avant de procéder à l'extraction avec l'éthanol. Cette période de macération a été indispensable pour achever la destruction et la digestion de la paroi cellulaire, électroporée lors du prétraitement, grâce à l'action d'enzyme intracellulaire estérase. Ce temps préalable avant l'extraction à l'éthanol semble donc être un facteur déterminant pour l'efficacité globale du procédé.

4 Résultats de l'étude avec *Sphaerocystis sp.*

L'extraction au DMSO des caroténoïdes totaux à partir de *Sphaerocystis sp.* a été assistée par des ultrasons, des champs électriques pulsés ou par broyage à billes. Le solvant DMSO a été choisi car il a permis d'obtenir les meilleurs taux d'extraction des caroténoïdes lors de l'étude avec *H.pluvialis*.

4.1 Effet des prétraitements physiques sur l'extraction

Une différence significative est constatée entre le rendement d'extraction des caroténoïdes obtenus par le traitement US et celui obtenu par le traitement CEP (voir Figure 72). Cependant, il convient de souligner que l'extraction au DMSO, qu'il soit combiné ou non avec le prétraitement US, a conduit à des rendements d'extraction étranges, dépassant même les 100% (voir Figure 71). Cette anomalie pourrait être attribuée à la présence d'impuretés dans l'échantillon utilisé, provenant soit de la biomasse elle-même, soit du solvant d'extraction. Ces impuretés pourraient donc être à l'origine de cette illusion d'un rendement d'extraction supérieur à 100%.

En conséquence, bien qu'il soit délicat de comparer directement l'effet des deux prétraitements sur le rendement d'extraction, il est possible que les ultrasons aient permis d'extraire une grande quantité de caroténoïdes avant l'étape d'extraction, avec un rendement qui pourrait se situer entre 40-60%. Ensuite, l'extraction au DMSO combiné au prétraitement US est supposée permettre d'atteindre le meilleur rendement final, soit entre 80-90%. Ce rendement proposé est censé être comparable à celui obtenu pour l'échantillon non traité dans le DMSO.

L'extraction au DMSO après traitement CEP augmente de manière significative le rendement d'extraction, passant de 10% avant l'étape d'extraction à un rendement de 82%. Cependant, pour cette souche également, le traitement par CEP semble être moins efficace que le traitement par US. Il semble davantage conduire à une fragilisation ou électroporation de la paroi, plutôt qu'à une rupture complète. Il apparaît alors que les barrières cellulaires de *Sphaerocystis sp.* ont été facilement détruites par les US dans les mêmes conditions utilisées pour la souche précédente d'*H.pluvialis* (énergie spécifique environ 1300 kJ/kg), qui a produit un rendement 40-45% en caroténoïdes totaux avant l'étape d'extraction.

4.2 Effet du broyage avec le DMSO

Dans nos conditions, l'extraction assistée par le broyage à bille a produit un rendement (78%) pratiquement identique à celui obtenu par l'extraction au DMSO combinée au traitement par CEP (82%).

En effet, l'extraction au DMSO, que ce soit sans traitement ou avec, a été observée pour améliorer le rendement d'extraction. Cette amélioration peut s'expliquer par la double efficacité de ce solvant : à la fois pour la perméabilisation des cellules et l'extraction des pigments (Saini & Keum, 2018).

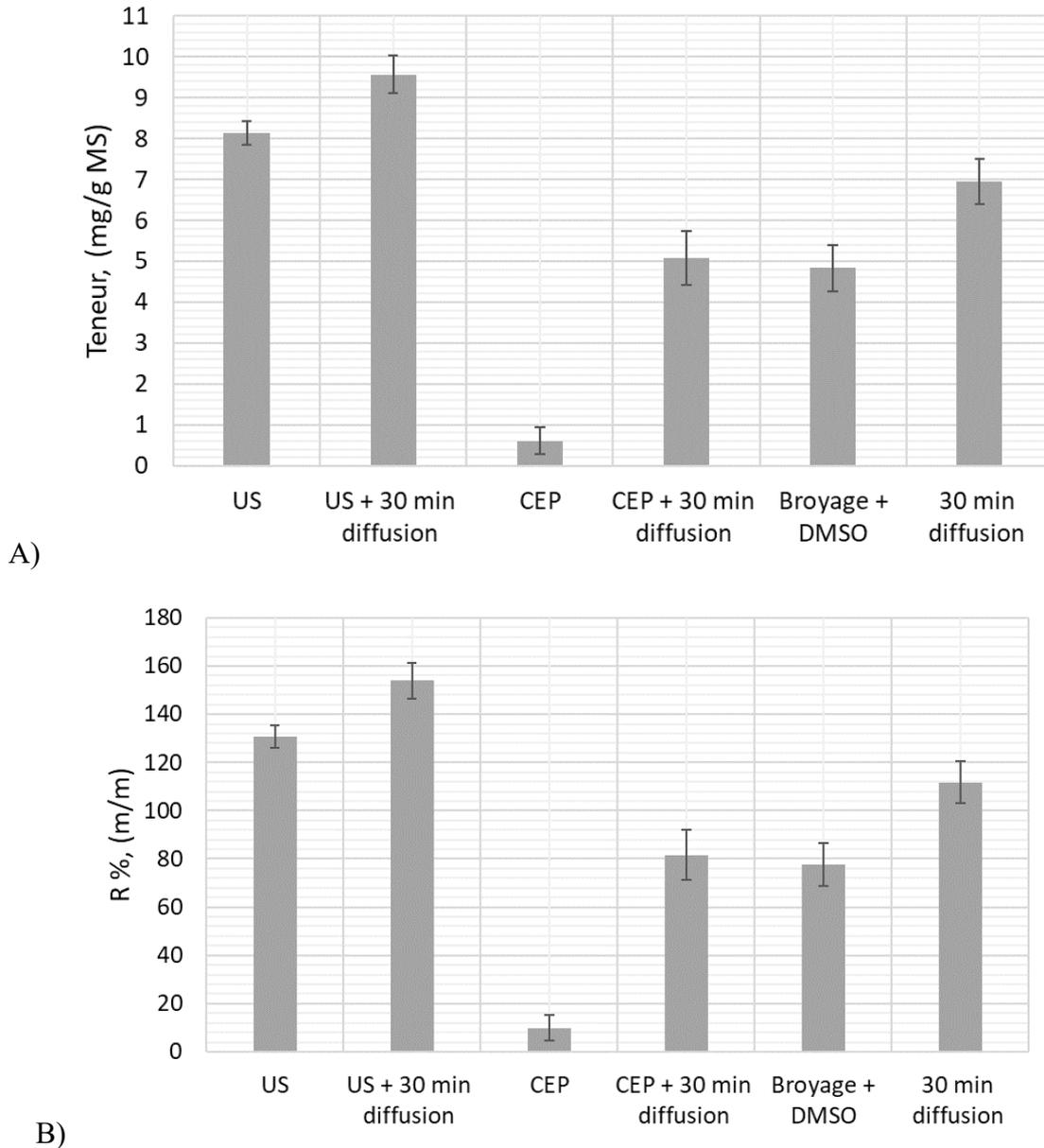


Figure 71 : Résultats d'extraction des caroténoïdes à partir de *Sphaerocystis sp.* par trois méthodes assistées, US, CEP et broyage à bille au DMSO et une méthode d'extraction au DMSO. (A) teneur de caroténoïdes totaux et (B) rendement d'extraction des caroténoïdes.

Les caroténoïdes secondaires ont représenté environ 70% des caroténoïdes totaux, dans l'ordre suivant : la canthaxanthine, l'astaxanthine et l'adonixanthine (**Tableau 20**).

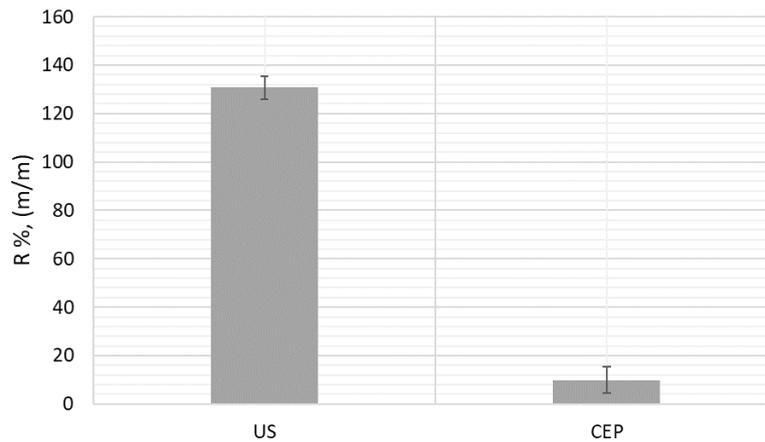


Figure 72 : Effet des prétraitements US et CEP sur le rendement d'extraction des caroténoïdes R en % de *Sphaerocystis sp.* (énergie spécifique environ 1300 kJ/kg).

5 Résultats de l'étude avec *Pleurastrum sp.*

En raison de la quantité de biomasse disponible pour cette souche de *Pleurastrum sp.*, seules les méthodes d'extraction, à savoir la méthode assistée par le broyage à bille dans le DMSO et l'extraction au DMSO, ont été étudiées. Ces méthodes ont produit des résultats similaires en termes de rendement extraction des caroténoïdes totaux. Dans les deux cas, la totalité des caroténoïdes a été extraite et nous n'avons pas constaté une différence significative (voir la **Figure 73**). En d'autres termes, l'utilisation du DMSO peut expliquer ce résultat d'efficacité de l'extraction.

En outre, l'efficacité observée du broyage à bille et du DMSO sur *Pleurastrum sp.* semble corroborer notre observation faite sur *H.pluvialis* et *Sphaerocystis sp.*

Les caroténoïdes totaux quantifiés pour la souche *Pleurastrum sp.*, se composent de caroténoïdes secondaires et de caroténoïdes primaires. Environ 50% des caroténoïdes totaux sont représentés par les deux caroténoïdes, dans l'ordre suivant : l'adonixanthine, la canthaxanthine, et l'astaxanthine, comme illustré dans le **Tableau 20**.

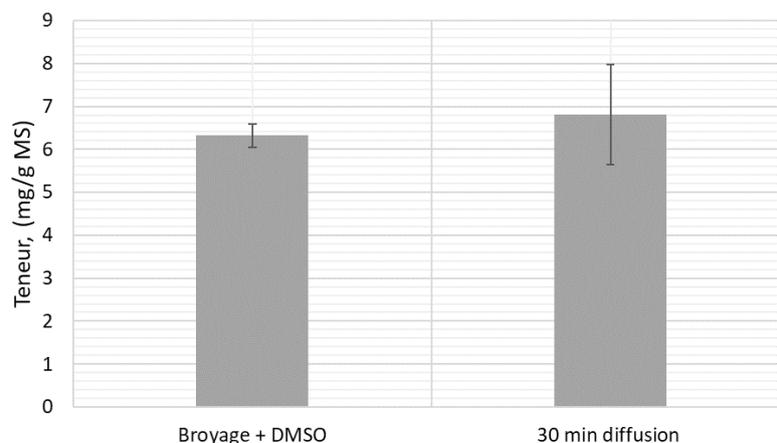


Figure 73 : Teneur en caroténoïdes totaux extraits de *Pleurastrum sp.* dans le DMSO sans ou après broyage à bille

6 Comparaison générale des caroténoïdes des souches étudiées

Les trois souches microalgales *H.pluvialis*, *Sphaerocystis sp.* et *Pleurastrum sp.*, produisent toutes des caroténoïdes secondaires, mais en différentes quantités, comme illustré dans le **Tableau 20**. Pour *H.pluvialis*, sa teneur maximale en caroténoïdes totaux est similaire à celle des caroténoïdes secondaires, car l'astaxanthine représente 90-95% des caroténoïdes totaux, accompagnée d'une petite quantité de lutéine et bêta carotène. Ce pourcentage est en accord avec la littérature (Aflalo et al., 2007).

En revanche, malgré la différence notable dans les teneurs en pigments, qui sont sept fois inférieure par rapport à ce qui est obtenu avec *H.pluvialis*, les deux souches psychrophiles ont révélé la présence d'une variété de pigments : des xanthophylles (zéaxanthine et violaxanthine), des caroténoïdes primaires (lutéine), et des caroténoïdes secondaires (canthaxanthine, astaxanthine et adonixanthine). Nous avons observé une production de caroténoïdes totaux relativement similaire. Néanmoins, les caroténoïdes secondaires ont constitué 70% du total des caroténoïdes totaux chez *Sphaerocystis sp.*, tandis que chez *Pleurastrum sp.* ils ne dépassent pas 50%. De plus, la séparation des caroténoïdes secondaires par HPTLC, a indiqué que les souches psychrophiles accumulent principalement de l'astaxanthine en mono-ester, comme *H.pluvialis*, comme l'illustre la **Figure 74**. Encore une fois, nous pouvons penser que l'estérification est une stratégie développée par ces microalgues pour protéger la molécule contre la dégradation lors de son accumulation (Leya, 2020).

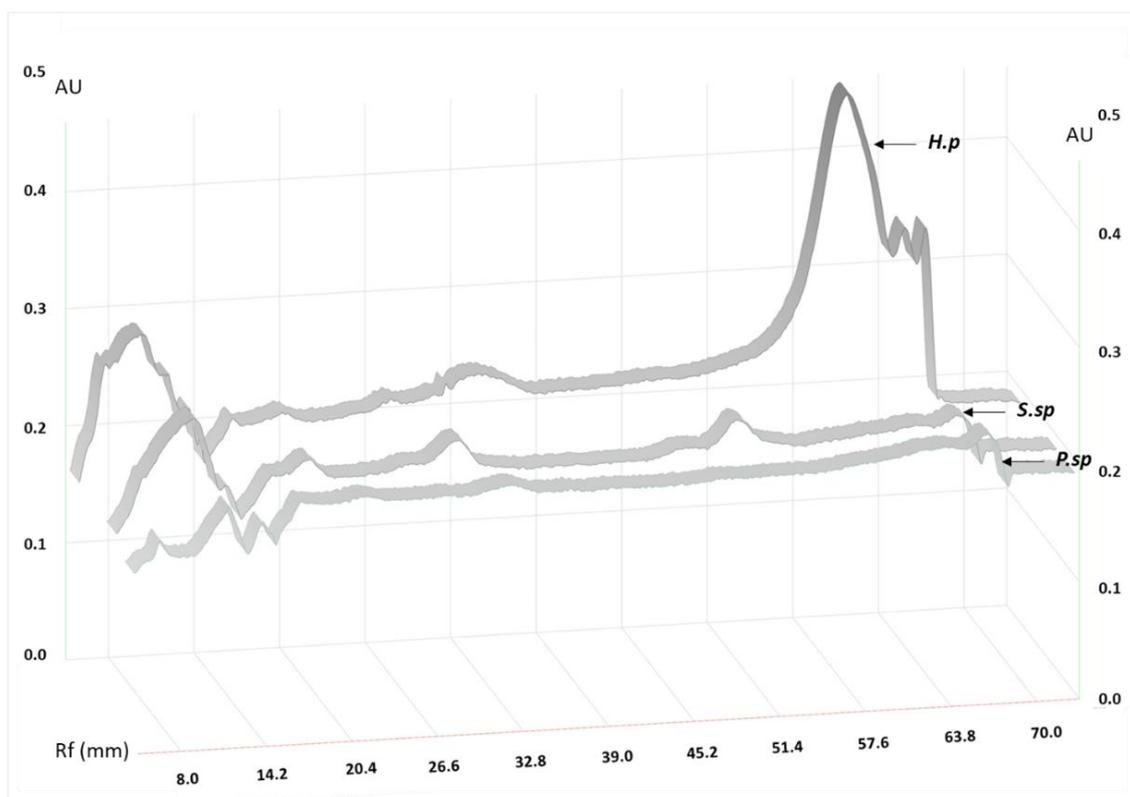


Figure 74 : Densitogramme de la séparation des caroténoïdes secondaires par la méthode HPTLC, l'absorbance à 256 nm en fonction de la distance de migration (Rf rapport frontal) pour *H.pluvialis* (H.p), *Sphaerocystis sp.* (S.sp) et *Pleurastrum sp.* (P.sp).

Tableau 20 : Teneurs maximales en pigments des trois microalgues *H.pluvialis*, *Sphaerocystis sp.* et *Pleurastrum sp.*, obtenu par le broyage à billes. (-) : pigment non détecté, Car.Tot : caroténoïdes totaux, Car.Sec: caroténoïdes secondaires, Ast : astaxanthine, Lut : lutéine, Zéa : zéaxanthine, Vio : violaxanthine, Adx : adonixanthine, Can : canthaxanthine, Chl a : chlorophylle a, Chl b : chlorophylle b.

Microalgue	Teneur (mg/g MS)											
	Spectro		HPLC-UV									
	Car.Tot 470 nm	Ast-totale 530 nm	Ast	Lut	Zéa	Vio	Adx	Can	Chl a	Chl b	$\Sigma_{\text{Car.Tot}}$	$\Sigma_{\text{Car.Sec}}$
<i>H.pluvialis</i>	40,8±3	38,7±3	16,3±0,5	1,46±0,06	traces	-	traces	-	-	-	17,8	16,3
<i>Sphaerocystis sp.</i>	6,2±0,1	4,4±0,4	0,81±0,02	0,40±0,02	0,02±0,00	0,06±0,00	0,60±0,01	1,64±0,1	1,82±0,1	1,00±0,04	3,5	3,1
<i>Pleurastrum sp.</i>	6,3±0,3	3,0±0,2	0,04±0,00	0,87±0,23	0,66±0,02	0,13±0,04	0,26±0,03	0,25±0,04	-	2,54±0,2	2,2	0,55

L'étude des trois souches permet de mettre en lumière la voie de biosynthèse de l'astaxanthine. Dans le cas de la microalgue *H.pluvialis*, l'astaxanthine peut être produite par deux voies. La première implique la conversion du bêta-carotène par l'intermédiaire de trois caroténoïdes : la bêta-cryptoxanthine, la zéaxanthine, et l'adonixanthine. La deuxième fait intervenir trois autres caroténoïdes : l'échninenone, la canthaxanthine et l'adonirubine (Grünewald et al., 2001). L'analyse par HPLC a permis de détecter deux pics de très faible intensité correspondant à la zéaxanthine et à l'adonixanthine. Cette observation suggère que la conversion du bêta-carotène en astaxanthine s'est faite principalement par la première voie. Toutefois, les souches psychrophiles ont montré la présence des intermédiaires de la canthaxanthine et de l'adonixanthine, ainsi que de la zéaxanthine. Cela suggère que ces souches pourraient utiliser les deux voies pour la biosynthèse de l'astaxanthine (Yuan et al., 2002). La **Figure 75** illustre les deux voies métaboliques impliquées dans la conversion de l'astaxanthine, en soulignant les caroténoïdes intermédiaires qui sont produits par les trois souches étudiées.

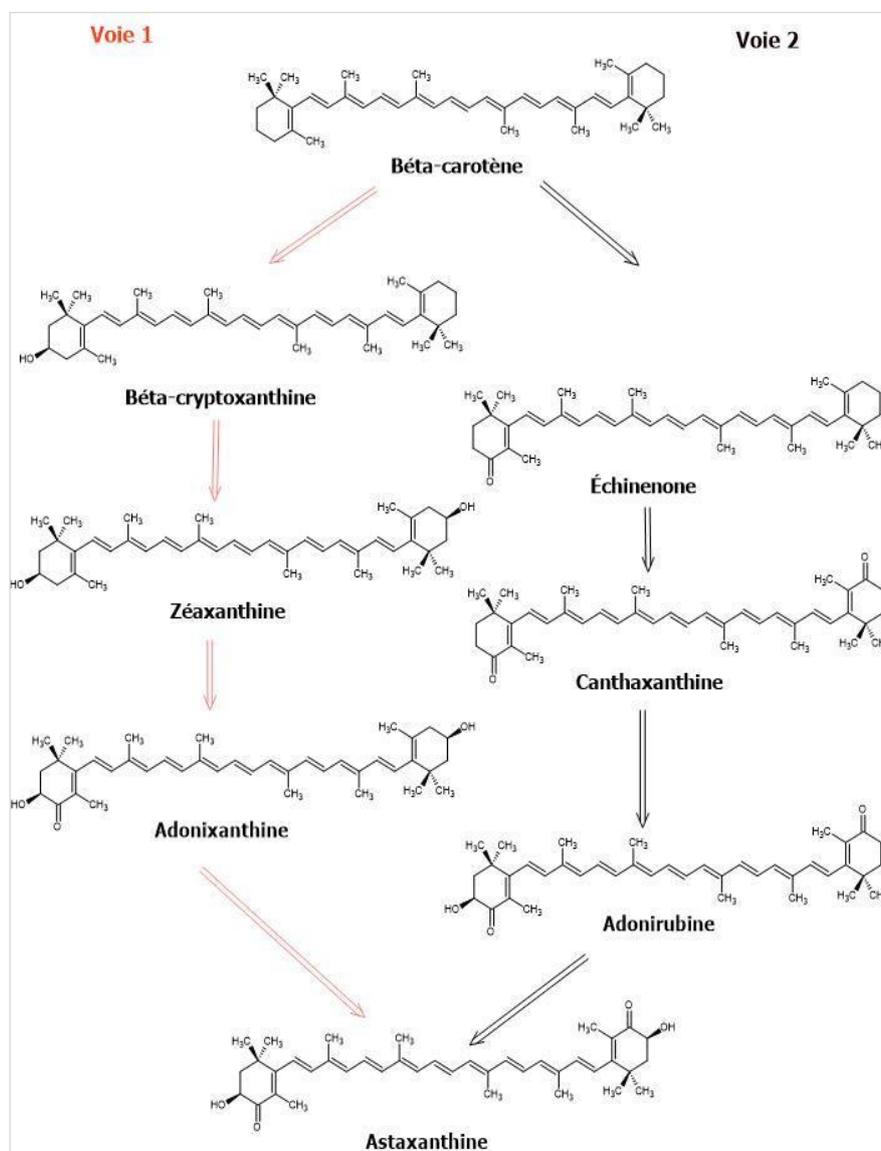


Figure 75 : Les deux voies de biosynthèse de l'astaxanthine suggérées pour les microalgues étudiées : *H.pluvialis*, *Sphaerocystis* sp. et *Pleurastrum* sp.

Durant notre étude, nous avons observé qu'il était difficile de comparer la somme des teneurs en pigments déterminées par HPLC-UV avec celles obtenues par spectrophotométrie. En effet, les microalgues peuvent produire des caroténoïdes secondaires sous différentes configurations chimiques, notamment des configurations trans ou cis, des isomères E/Z ou des esters. Toutes ces formes peuvent absorber à la même longueur d'onde que l'astaxanthine.

Cependant, ces variations de formes ne sont pas nécessairement détectables par HPLC couplée à un détecteur UV utilisant une colonne C18. L'utilisation d'une colonne C30 pour détecter ces diverses formes peut aider à surmonter cette difficulté (Honda et al., 2019; Takaichi, 2020).

De plus, bien que la saponification chimique ait amélioré la teneur en astaxanthine libre par la méthode HPLC, l'utilisation du NaOH peut provoquer l'isomérisation ou même la dégradation de pigments, ce qui peut affecter les résultats de la quantification (Su et al., 2018).

Par conséquent, les différences observées pourraient être dues à ces facteurs, et des recherches supplémentaires seraient nécessaires pour confirmer.

7 Conclusion

Notre étude a porté sur l'évaluation de l'efficacité de différentes méthodes d'extraction des caroténoïdes à partir des deux souches psychrophiles, *Sphaerocystis sp.* et *Pleurastrum sp.*, et de la comparaison à la souche de référence *H. pluvialis*.

D'abord, l'évaluation de l'impact du solvant sur le rendement d'extraction d'astaxanthine a révélé que les rendements varient en fonction de l'efficacité des solvants : DMSO > acétone > MeOH > EtOH. En particulier, le DMSO a permis d'atteindre le rendement le plus élevé des caroténoïdes totaux d'*H. pluvialis*, soit 88%, en seulement 30 minutes d'extraction.

Néanmoins, pour mettre en évidence l'effet des prétraitements US et CEP, l'éthanol a été sélectionné. nous avons choisi d'utiliser l'éthanol. Nos observations ont montré que ces prétraitements accélèrent la cinétique d'extraction, avec ou sans éthanol, permettant d'atteindre l'équilibre (30 à 45% de rendement, et même 73% avec US+EtOH) en seulement 5 à 10 minutes. À titre de comparaison, l'extraction dans l'éthanol sans prétraitement a nécessité environ 24 heures pour atteindre un rendement de 40%.

Nous avons observé que l'extraction à l'éthanol après traitement CEP n'augmente que légèrement le rendement (40-45% au lieu de 30-35%), contrairement après traitement US (70-75% au lieu de 40-45%). Il semble donc que le traitement par CEP soit moins efficace que le traitement par US, conduisant davantage à une fragilisation ou électroporation de la paroi, plutôt qu'à une rupture complète.

En ce qui concerne la souche *Sphaerocystis sp.*, malgré la difficulté de comparer les effets de prétraitements sur les rendements d'extraction des caroténoïdes, il est possible que les ultrasons permettent d'extraire davantage de caroténoïdes avant l'étape d'extraction, avec un rendement potentiel de 40-60%. De plus, l'extraction au DMSO combiné au prétraitement US a été supposée permettre d'atteindre le meilleur rendement final, soit entre 80-90%. Ce rendement est censé être comparable à celui obtenu avec l'échantillon non traité.

L'extraction au DMSO après le traitement CEP a significativement augmenté le rendement d'extraction, passant de 10% avant l'étape d'extraction à un rendement de 82%. Ainsi, le traitement par CEP semble être moins efficace que le traitement par US, tels qu'observé sur *H.pluvialis*.

Avec la souche *Pleurastrum sp.* l'efficacité observée du broyage à bille et du DMSO a corroborer nos observations faites sur *H.pluvialis* et *Sphaerocystis sp.*, car les rendements d'extraction ont été de 75-95%.

Dans le cas des souches psychrophiles, le diméthylsulfoxyde a été choisi comme solvant en raison de sa capacité à dissoudre les caroténoïdes présents dans les microalgues et pour obtenir des rendements maximaux. Néanmoins, pour les recherches futures, il serait envisageable une éco extraction, qui privilégie l'utilisation de solvants plus écologiques, comme l'éthanol.

Et enfin, malgré une production de caroténoïdes 7 fois inférieure à celle d'*H.pluvialis*, les microalgues psychrophiles ont démontré une diversité de pigments, tels les chlorophylles, l'astaxanthine, l'adonixanthine, la canthaxanthine, et la lutéine. Aussi, les trois souches étudiées ont semblé avoir des voies métaboliques similaires pour la conversion d'astaxanthine.

Conclusions et perspectives

Cette thèse est le fruit d'une collaboration entre le laboratoire de Transformations Intégrées de la Matière Renouvelable à l'Université de Technologie de Compiègne et la Chaire de Biotechnologie de CentraleSupélec. L'objectif était d'étudier la croissance de deux souches psychrophiles prometteuses, *Sphaerocystis sp.* et *Pleurastrum sp.*, puis leur production de caroténoïdes, en particulier secondaires tels que l'astaxanthine, après l'induction d'un stress. Par ailleurs, la thèse visait à étudier des procédés innovants de prétraitement (champs électriques pulsés et ultrasons) afin d'améliorer l'extraction des caroténoïdes des microalgues.

Tout d'abord, nous avons étudié la croissance lors de la phase verte. Nous avons analysé les effets de la variation des paramètres, tels que la température (à 12°C et 14 °C), l'intensité lumineuse (à 39, 49 et 78 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) et la source de carbone (1%, 2% de CO_2 sans et avec bicarbonate). Notre objectif était de déterminer les conditions opératoires les plus favorables pour atteindre un taux de croissance optimal et produire une quantité de biomasse suffisante pour envisager une production à l'échelle d'un photo-bioréacteur de 5 litres. Pour *Pleurastrum sp.*, les meilleurs résultats ont été : une température de 12 °C, 2% de CO_2 et une intensité lumineuse de 78 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ avec un taux de croissance de 0,23 jour^{-1} et une concentration en matière sèche finale de 1,2 g/L, après 11 jours de culture dans le milieu BBM. Pour *Sphaerocystis sp.*, les conditions les plus appropriées ont été comme suivantes : 12 °C de température, avec 1% de CO_2 et une intensité lumineuse de 78 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, ayant produit un taux de croissance de 0,38 jour^{-1} et une concentration en matière sèche finale de 1,45 g/L, après 11 jours de culture dans le milieu BBM.

Ensuite, après avoir maîtrisé la culture des deux souches, nos efforts se sont concentrés sur l'étude des facteurs de stress qui permettent la transition de la phase verte à la phase rouge, en vue de produire des caroténoïdes secondaires. Nous avons analysé les effets combinés de la variation des paramètres tels que les carences en nutriments (azote et phosphore), l'intensité lumineuse élevée et le stress salin. Les résultats ont indiqué que la souche *Sphaerocystis sp.* est la microalgue la plus facile à cultiver (culture en suspension) et surtout à stresser sur les deux échelles, fiole Erlenmeyer de 100 mL et photo-bioréacteur de 6 L. En effet, cette souche est capable de produire de la canthaxanthine et de l'adonixanthine après une simple carence naturelle en azote, et une augmentation de l'intensité lumineuse (300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$), en une seule étape (sans avoir besoin de changer de milieu ou de photobioréacteur). En comparaison, la souche *Pleurastrum sp.* est plus difficile à cultiver puis à stresser car elle avait la particularité de former des floes et parfois des biofilms en photobioréacteur de 5 L, sachant que la maîtrise de la forme cellulaire est un facteur déterminant pour l'induction de la synthèse puis l'extraction des caroténoïdes. Néanmoins, cette souche est également capable de produire de la canthaxanthine et de l'adonixanthine.

Les facteurs de stress abiotiques ont entraîné différents effets sur la production des caroténoïdes secondaires. Nos observations sur la souche *Sphaerocystis sp.* ont permis de constater que la combinaison de deux carences initiales, en azote et en phosphore, avec ou sans une salinité élevée dans le milieu, pouvait stimuler la production finale de caroténoïdes, primaires, xanthophylles et secondaires. Cependant, c'est uniquement le stress provoqué par une carence initiale en azote combinée à une lumière intense qui pouvait conduire à la production de la canthaxanthine et l'astaxanthine. À partir de ces résultats, il est compris que la carence en azote (induite ou naturelle), associée à une lumière intense, soit la meilleure condition testée pour produire les deux caroténoïdes d'intérêt, la canthaxanthine et l'astaxanthine.

Quant à la souche *Pleurastrum sp.*, nous avons déterminé que l'exposition des floes à une forte intensité lumineuse dans le milieu BBM (témoin), ou combiné à une carence en phosphate (C), a conduit à la plus haute teneur en caroténoïdes totaux et secondaires. La carence en azote a influencé négativement l'accumulation des caroténoïdes secondaires chez *Pleurastrum sp.*, malgré que le fait que cette carence a entraîné une transition plus rapide du vert à l'orange en une semaine. D'un autre côté, le stress oxydatif causé par une salinité élevée semble entraîner une diminution des teneurs en pigments si le stress dure plus d'une semaine.

Les résultats les plus prometteurs ont été obtenus avec *Sphaerocystis sp.*, pour laquelle les caroténoïdes secondaires constituent 86,4% des caroténoïdes totaux quantifiés en fin de phase rouge. En revanche, avec *Pleurastrum sp.*, les caroténoïdes secondaires ne représentent que 41,6% des caroténoïdes totaux, alors que la lutéine atteint environ 48%. Cependant, la lutéine est un caroténoïde primaire qui est aussi valorisable. Les deux souches ont produit une teneur relativement élevée et similaire en canthaxanthine, le principal caroténoïde secondaire analysé jusqu'à 1,6 mg/g MS. Lors de la culture en PBR, *Pleurastrum sp.* a présenté une teneur plus élevée en adonixanthine que *Sphaerocystis sp.* (1,3 mg/g contre 0,6 mg/g). Cependant, *Sphaerocystis sp.* a produit 0,8 mg/g d'astaxanthine alors que le pigment n'a pas été détecté avec *Pleurastrum sp.*

La souche *Sphaerocystis sp.* semble présenter un potentiel semblable à celui de *H. pluvialis* pour la production de biomasse puis de caroténoïdes dans le même photobioréacteur. Cependant, des recherches sont encore nécessaires pour optimiser sa culture puis l'induction du stress à l'échelle du photobioréacteur. Un système "air-lift" a été choisi lors de la thèse afin d'assurer l'apport de CO₂ et le mélange de la suspension microalgale. Cependant les teneurs en caroténoïdes secondaires sont encore insuffisantes pour pouvoir rivaliser avec les cultures de *H. pluvialis* à l'échelle industrielle.

Enfin, ce travail a permis d'évaluer l'efficacité de différentes méthodes d'extraction des caroténoïdes à partir des deux souches psychrophiles, et de les comparer à la souche de référence *H. pluvialis*. Les résultats de notre étude ont révélé que :

- Sur *H. pluvialis*, l'efficacité des solvants dans l'extraction de des caroténoïdes varie, le DMSO étant le plus efficace, suivi de l'acétone, du MeOH et de l'EtOH. Le DMSO permet d'atteindre un rendement de 88% en 30 minutes.

-
- Les prétraitements par ultrasons (US) et par champ électrique pulsé (CEP) accélèrent la cinétique d'extraction avec l'éthanol, permettant d'atteindre l'équilibre en 5 à 10 minutes. Sans prétraitement, l'éthanol nécessite 24 heures pour atteindre un rendement de 40%.
 - L'extraction à l'éthanol après traitement CEP n'augmente que légèrement le rendement (de 30-35% à 40-45%), contrairement au traitement US qui permet d'atteindre un rendement de 70-75%.
 - Sur la souche *Sphaerocystis sp.*, les ultrasons semblent permettre d'extraire davantage de caroténoïdes avant l'étape d'extraction, avec un rendement potentiel de 40-60%. L'extraction au DMSO combinée au prétraitement US pourrait permettre d'atteindre un rendement final de 80-90%.
 - L'extraction au DMSO après le traitement CEP augmente significativement le rendement d'extraction, passant de 10% à 82%. Le traitement par CEP semble être moins efficace que le traitement par US.
 - Sur la souche *Pleurastrum sp.*, le broyage à bille et le DMSO sont efficaces, avec des rendements d'extraction de 75-95%.

Il serait pertinent d'évaluer l'impact des ultrasons sur les souches psychrophiles. Cependant, la consommation élevée d'énergie associée à cette méthode et la nécessité de mise à l'échelle sont des préoccupations importantes à considérer lors de l'extraction des caroténoïdes.

Le diméthylsulfoxyde a été principalement choisi comme solvant en raison de sa capacité à dissoudre les caroténoïdes présents dans les microalgues. Pour les recherches futures, il serait donc intéressant d'envisager une éco-extraction, qui privilégie l'utilisation de solvants plus écologiques, comme l'éthanol.

En guise de conclusion, ces résultats devraient contribuer à construire une base solide pour l'optimisation future des procédés d'extraction, visant à maximiser le rendement des caroténoïdes ciblés des souches sélectionnées, en cas d'une production de masse. Cela nécessitera donc de rechercher plus sur les méthodes d'extraction plus respectueuses de l'environnement, rapides et économes en énergie. Cette étude ouvre donc des perspectives prometteuses pour l'exploitation des microalgues psychrophiles dans la production de caroténoïdes.

Références bibliographiques

- Abreu, A. P., Morais, R. C., Teixeira, J. A., & Nunes, J. (2022). A comparison between microalgal autotrophic growth and metabolite accumulation with heterotrophic, mixotrophic and photoheterotrophic cultivation modes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 159, 112247. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.112247>
- Achat, S. (2013). *Polyphénols de l'alimentation: Extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques* [Phdthesis, Université d'Avignon ; Université Abderrahmane Mira - Bejaïa (Bejaïa, Algérie)]. <https://theses.hal.science/tel-00978529>
- Aflalo, C., Meshulam, Y., Zarka, A., & Boussiba, S. (2007). On the relative efficiency of two- vs. One-stage production of astaxanthin by the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(1), 300–305. <https://doi.org/10.1002/bit.21391>
- Ahirwar, A., Khan, M. J., Sirotiya, V., Mourya, M., Rai, A., Schoefs, B., Marchand, J., Varjani, S., & Vinayak, V. (2022). Pulsed Electric Field–Assisted Cell Permeabilization of Microalgae (*Haematococcus pluvialis*) for Milking of Value-Added Compounds. *BioEnergy Research*, 1–14. <https://doi.org/doi.org/10.1007/s12155-022-10414-4>
- Ahmad, A. L., Mat Yasin, N. H., Derek, C. J. C., & Lim, J. K. (2012). Crossflow microfiltration of microalgae biomass for biofuel production. *Desalination*, 302, 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2012.06.026>
- Alavijeh, R. S., Karimi, K., Wijffels, R. H., van den Berg, C., & Eppink, M. (2020). Combined bead milling and enzymatic hydrolysis for efficient fractionation of lipids, proteins,

-
- and carbohydrates of *Chlorella vulgaris* microalgae. *Bioresource Technology*, 309, 123321. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123321>
- Ambati, R. R., Gogisetty, D., Aswathanarayana, R. G., Ravi, S., Bikkina, P. N., Bo, L., & Yuepeng, S. (2019). Industrial potential of carotenoid pigments from microalgae: Current trends and future prospects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(12), 1880–1902. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1432561>
- Amengual, J. (2019). Bioactive Properties of Carotenoids in Human Health. *Nutrients*, 11(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/nu11102388>
- Ampofo, J., & Abbey, Lord. (2022). Microalgae: Bioactive Composition, Health Benefits, Safety and Prospects as Potential High-Value Ingredients for the Functional Food Industry. *Foods*, 11(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/foods11121744>
- Barbara Clément-Larosière. (2012). *Etude de la croissance de Chlorella vulgaris en photobioréacteur batch et continu, en présence de concentrations élevées de CO₂*.
- Bauer, A., & Minceva, M. (2019). Direct extraction of astaxanthin from the microalgae *Haematococcus pluvialis* using liquid–liquid chromatography. *RSC Advances*, 9(40), 22779–22789. <https://doi.org/10.1039/C9RA03263K>
- Ben-Amotz, A. (1995). New mode of *Dunaliella* biotechnology: Two-phase growth for β -carotene production. *Journal of Applied Phycology*, 7(1), 65–68. <https://doi.org/10.1007/BF00003552>

-
- Bhalamurugan, G. L., Valerie, O., & Mark, L. (2018). Valuable bioproducts obtained from microalgal biomass and their commercial applications: A review. *Environmental Engineering Research*, 23(3), 229–241. <https://doi.org/10.4491/eer.2017.220>
- Bocker, R., & Silva, E. K. (2022). Pulsed electric field assisted extraction of natural food pigments and colorings from plant matrices. *Food Chemistry: X*, 15, 100398. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100398>
- Bodenes, P. (2017). *Study of the application of pulsed electric fields (PEF) on microalgae for the extraction of neutral lipids.*
- Bogacz-Radomska, L., & Harasym, J. (2018). β -Carotene—Properties and production methods. *Food Quality and Safety*, 2(2), 69–74. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy004>
- Boussiba, S. (2000). Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. *Physiologia Plantarum*, 108(2), 111–117. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2000.108002111.x>
- Boussiba, S., Fan, L., & Vonshak, A. (1992). [36] Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green alga *Haematococcus pluvialis*. In *Methods in Enzymology* (Vol. 213, pp. 386–391). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(92\)13140-S](https://doi.org/10.1016/0076-6879(92)13140-S)
- Britton, G. (2008). Functions of Intact Carotenoids. In G. Britton, S. Liaaen-Jensen, & H. Pfander (Eds.), *Carotenoids: Volume 4: Natural Functions* (pp. 189–212). Birkhäuser. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-7499-0_10

- B. Williams, P. J. le, & L. Laurens, L. M. (2010). Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. *Energy & Environmental Science*, 3(5), 554–590. <https://doi.org/10.1039/B924978H>
- Calijuri, M. L., Silva, T. A., Magalhães, I. B., Pereira, A. S. A. de P., Marangon, B. B., Assis, L. R. de, & Lorentz, J. F. (2022). Bioproducts from microalgae biomass: Technology, sustainability, challenges and opportunities. *Chemosphere*, 305, 135508. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135508>
- Casella, P., Iovine, A., Mehariya, S., Marino, T., Musmarra, D., & Molino, A. (2020). Smart Method for Carotenoids Characterization in *Haematococcus pluvialis* Red Phase and Evaluation of Astaxanthin Thermal Stability. *Antioxidants*, 9(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/antiox9050422>
- Certik, M., & Shimizu, S. (1999). Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87(1), 1–14. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(99\)80001-2](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(99)80001-2)
- Cervantes-Paz, B., Victoria-Campos, C. I., & Ornelas-Paz, J. de J. (2016). Absorption of Carotenoids and Mechanisms Involved in Their Health-Related Properties. In C. Stange (Ed.), *Carotenoids in Nature: Biosynthesis, Regulation and Function* (pp. 415–454). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39126-7_16
- Chen, J.-H., Wei, D., Ranga Rao, A., & Ravishankar, G. A. (2021). Astaxanthin from *Chromochloris zofingiensis*: Feasibility analysis. In *Global Perspectives on*

-
- Astaxanthin* (pp. 37–59). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823304-7.00008-8>
- Cheng, X., & Shah, M. (2021). Bioextraction of astaxanthin adopting varied techniques and downstream processing methodologies. In *Global Perspectives on Astaxanthin* (pp. 313–339). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823304-7.00028-3>
- Chini Zittelli, G., Lauceri, R., Faraloni, C., Silva Benavides, A. M., & Torzillo, G. (2023). Valuable pigments from microalgae: Phycobiliproteins, primary carotenoids, and fucoxanthin. *Photochemical & Photobiological Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s43630-023-00407-3>
- Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I., & Florou-Paneri, P. (2013). Functional properties of carotenoids originating from algae: Functional properties of algal carotenoids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(1), 5–11. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5902>
- Christian, D., Zhang, J., Sawdon, A. J., & Peng, C.-A. (2018). Enhanced astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* using high carbon dioxide concentration and light illumination. *Bioresource Technology*, 256, 548–551. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.074>
- Corrêa, P. S., Morais Júnior, W. G., Martins, A. A., Caetano, N. S., & Mata, T. M. (2021). Microalgae Biomolecules: Extraction, Separation and Purification Methods. *Processes*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/pr9010010>

- Costa, J. A. V., & de Morais, M. G. (2014). Chapter 1—An Open Pond System for Microalgal Cultivation. In A. Pandey, D.-J. Lee, Y. Chisti, & C. R. Soccol (Eds.), *Biofuels from Algae* (pp. 1–22). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59558-4.00001-2>
- Cvetkovska, M., Hüner, N. P. A., & Smith, D. R. (2017). Chilling out: The evolution and diversification of psychrophilic algae with a focus on Chlamydomonadales. *Polar Biology*, *40*(6), 1169–1184. <https://doi.org/10.1007/s00300-016-2045-4>
- Dixon, C., & Wilken, L. R. (2018). Green microalgae biomolecule separations and recovery. *Bioresources and Bioprocessing*, *5*(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0199-3>
- Doppler, P., Kriechbaum, R., Käfer, M., Kopp, J., Remias, D., & Spadiut, O. (2022). *Coelastrella terrestris* for Adonixanthin Production: Physiological Characterization and Evaluation of Secondary Carotenoid Productivity. *Marine Drugs*, *20*(3), 175. <https://doi.org/10.3390/md20030175>
- Dubinsky, Z. (2013). *Photosynthesis*. BoD – Books on Demand.
- Dutta, S., Kumar, S. P. J., & Banerjee, R. (2023). A comprehensive review on astaxanthin sources, structure, biochemistry and applications in the cosmetic industry. *Algal Research*, *74*, 103168. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103168>
- Duval, B., Shetty, K., & Thomas, W. H. (1999). Phenolic compounds and antioxidant properties in the snow alga *Chlamydomonas nivalis* after exposure to UV light. *Journal of Applied Phycology*, *11*(6), 559–566. <https://doi.org/10.1023/A:1008178208949>

-
- E. Camp, J., B. Nyamini, S., & J. Scott, F. (2020). Cyrene™ is a green alternative to DMSO as a solvent for antibacterial drug discovery against ESKAPE pathogens. *RSC Medicinal Chemistry*, 11(1), 111–117. <https://doi.org/10.1039/C9MD00341J>
- Eppink, M. H. M., Olivieri, G., Reith, H., van den Berg, C., Barbosa, M. J., & Wijffels, R. H. (2019). From Current Algae Products to Future Biorefinery Practices: A Review. In K. Wagemann & N. Tippkötter (Eds.), *Biorefineries* (pp. 99–123). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/10_2016_64
- Ernst, H. (2002). Recent advances in industrial carotenoid synthesis. *Pure and Applied Chemistry*, 74(11), 2213–2226. <https://doi.org/10.1351/pac200274112213>
- Esteves, A. F., Almeida, C. J., Gonçalves, A. L., & Pires, J. C. (2020). Chapter 10—Microalgae harvesting techniques. In E. Jacob-Lopes, M. M. Maroneze, M. I. Queiroz, & L. Q. Zepka (Eds.), *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products* (pp. 225–281). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818536-0.00010-5>
- Fan, J., Cui, Y., Wan, M., Wang, W., & Li, Y. (2014). Lipid accumulation and biosynthesis genes response of the oleaginous *Chlorella pyrenoidosa* under three nutrition stressors. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 17. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-17>
- Fan, L., Vonshak, A., & Boussiba, S. (1994). Effect of Temperature and Irradiance on Growth of *Haematococcus Pluvialis* (chlorophyceae)1. *Journal of Phycology*, 30(5), 829–833. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1994.00829.x>
- Fei, Z., Fan, F., Liao, J., Wan, M., Bai, W., Wang, W., He, M., & Li, Y. (2022). Improving astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* on the outdoor large scale

-
- cultivation by optimizing the disinfection strategy of photobioreactor. *Algal Research*, 64, 102708. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102708>
- Fogg, G. E., & Smith, J. E. (1997). Observations on the snow algae of the South Orkney Islands. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 252(777), 279–287. <https://doi.org/10.1098/rstb.1967.0018>
- Foong, L. C., Loh, C. W. L., Ng, H. S., & Lan, J. C.-W. (2021). Recent development in the production strategies of microbial carotenoids. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(1), 12. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02967-3>
- Goettel, M., Eing, C., Gusbeth, C., Straessner, R., & Frey, W. (2013). Pulsed electric field assisted extraction of intracellular valuables from microalgae. *Algal Research*, 2(4), 401–408. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.07.004>
- Gómez, P. I., & González, M. A. (2005). The effect of temperature and irradiance on the growth and carotenogenic capacity of seven strains of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) cultivated under laboratory conditions. *Biological Research*, 38(2–3), 151–162. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602005000200005>
- Gong, M., & Bassi, A. (2016). Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnology Advances*, 34(8), 1396–1412. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.10.005>
- González-Peña, M. A., Ortega-Regules, A. E., Anaya de Parrodi, C., & Lozada-Ramírez, J. D. (2023). Chemistry, Occurrence, Properties, Applications, and Encapsulation of Carotenoids—A Review. *Plants*, 12(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/plants12020313>

- Gorgich, M., Martins, A. A., Mata, T. M., & Caetano, N. S. (2021). Composition, cultivation and potential applications of *Chlorella zofingiensis* – A comprehensive review. *Algal Research*, 60, 102508. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102508>
- Grimi, N., Dubois, A., Marchal, L., Jubeau, S., Lebovka, N. I., & Vorobiev, E. (2014). Selective extraction from microalgae *Nannochloropsis sp.* Using different methods of cell disruption. *Bioresource Technology*, 153, 254–259. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.011>
- Grujić, V. J., Todorović, B., Kranvogel, R., Ciringier, T., & Ambrožič-Dolinšek, J. (2022). Diversity and Content of Carotenoids and Other Pigments in the Transition from the Green to the Red Stage of *Haematococcus pluvialis* Microalgae Identified by HPLC-DAD and LC-QTOF-MS. *Plants*, 11(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/plants11081026>
- Grünewald, K., Hirschberg, J., & Hagen, C. (2001). Ketocarotenoid Biosynthesis Outside of Plastids in the Unicellular Green Alga *Haematococcus pluvialis* *. *Journal of Biological Chemistry*, 276(8), 6023–6029. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006400200>
- Gupta, A. K., Seth, K., Maheshwari, K., Baroliya, P. K., Meena, M., Kumar, A., Vinayak, V., & Harish. (2021). Biosynthesis and extraction of high-value carotenoid from algae. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 26(6), Article 6. <https://doi.org/10.52586/4932>
- Hamilton, R. J., & Sewell, P. A. (1982). Introduction to high performance liquid chromatography. In R. J. Hamilton & P. A. Sewell (Eds.), *Introduction to high performance liquid chromatography* (pp. 1–12). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-009-5938-5_1

- Harker, M., Tsavalos, A. J., & Young, A. J. (1996). Factors responsible for astaxanthin formation in the Chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 55(3), 207–214. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(95\)00002-X](https://doi.org/10.1016/0960-8524(95)00002-X)
- Harvey, P. J., & Ben-Amotz, A. (2020). Towards a sustainable *Dunaliella salina* microalgal biorefinery for 9-cis β -carotene production. *Algal Research*, 50, 102002. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102002>
- Henríquez, V., Escobar, C., Galarza, J., & Gimpel, J. (2016). Carotenoids in Microalgae. In C. Stange (Ed.), *Carotenoids in Nature: Biosynthesis, Regulation and Function* (pp. 219–237). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39126-7_8
- Hoham, R. W. (1975). Optimum Temperatures and Temperature Ranges for Growth of Snow Algae. *Arctic and Alpine Research*, 7(1), 13. <https://doi.org/10.2307/1550094>
- Hoham, R. W., & Remias, D. (2020). Snow and Glacial Algae: A Review ¹. *Journal of Phycology*, 56(2), 264–282. <https://doi.org/10.1111/jpy.12952>
- Honda, M., Kageyama, H., Hibino, T., Zhang, Y., Diono, W., Kanda, H., Yamaguchi, R., Takemura, R., Fukaya, T., & Goto, M. (2019). Improved Carotenoid Processing with Sustainable Solvents Utilizing Z-Isomerization-Induced Alteration in Physicochemical Properties: A Review and Future Directions. *Molecules*, 24(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/molecules24112149>
- Hulatt, C. J., Berecz, O., Egeland, E. S., Wijffels, R. H., & Kiron, V. (2017). Polar snow algae as a valuable source of lipids? *Bioresource Technology*, 235, 338–347. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.130>

- Ighalo, J. O., Dulta, K., Kurniawan, S. B., Omoarukhe, F. O., Ewuzie, U., Eshiemogie, S. O., Ojo, A. U., & Abdullah, S. R. S. (2022). Progress in Microalgae Application for CO₂ Sequestration. *Cleaner Chemical Engineering*, 3, 100044. <https://doi.org/10.1016/j.clce.2022.100044>
- Imamoglu, E., Dalay, M. C., & Sukan, F. V. (2009). Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *New Biotechnology*, 26(3), 199–204. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2009.08.007>
- Jannel, S., Caro, Y., Bermudes, M., & Petit, T. (2020). Novel Insights into the Biotechnological Production of *Haematococcus pluvialis*-Derived Astaxanthin: Advances and Key Challenges to Allow Its Industrial Use as Novel Food Ingredient. *Journal of Marine Science and Engineering*, 8(10), 789. <https://doi.org/10.3390/jmse8100789>
- Jeon, S., Koh, H. G., Cho, J. M., Kang, N. K., & Chang, Y. K. (2021). Enhancement of lipid production in *Nannochloropsis salina* by overexpression of endogenous NADP-dependent malic enzyme. *Algal Research*, 54, 102218. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102218>
- Kandasamy, S., Zhang, B., He, Z., Bhuvanendran, N., EL-Seesy, A. I., Wang, Q., Narayanan, M., Thangavel, P., & Dar, M. A. (2022). Microalgae as a multipotential role in commercial applications: Current scenario and future perspectives. *Fuel*, 308, 122053. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.122053>
- Kaparapu, J. (2018). *Application of Microalgae in Aquaculture*. 48, 21–26.

- Kawasaki, S., Mitsui, T., Omori, K., Tsuboya, T., Bader, A., Toyoshima, H., & Takaichi, S. (2023). Microalgal AstaP is a natural solubilizer of astaxanthin with broad binding ability for carotenoids and related compounds. *Algal Research*, 70, 102982. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.102982>
- Khan, S., Naushad, M., Iqbal, J., Bathula, C., & Sharma, G. (2022). Production and harvesting of microalgae and an efficient operational approach to biofuel production for a sustainable environment. *Fuel*, 311, 122543. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.122543>
- Kim, B., Youn Lee, S., Lakshmi Narasimhan, A., Kim, S., & Oh, Y.-K. (2022). Cell disruption and astaxanthin extraction from *Haematococcus pluvialis*: Recent advances. *Bioresource Technology*, 343, 126124. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126124>
- Kim, D.-Y., Vijayan, D., Praveenkumar, R., Han, J.-I., Lee, K., Park, J.-Y., Chang, W.-S., Lee, J.-S., & Oh, Y.-K. (2016). Cell-wall disruption and lipid/astaxanthin extraction from microalgae: *Chlorella* and *Haematococcus*. *Bioresource Technology*, 199, 300–310. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.107>
- Kim, J., Yoo, G., Lee, H., Lim, J., Kim, K., Kim, C. W., Park, M. S., & Yang, J.-W. (2013). Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 31(6), 862–876. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.04.006>
- Kim, S.-K. (2015). *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*. Academic Press.

-
- Kobayashi, M., Kurimura, Y., Kakizono, T., Nishio, N., & Tsuji, Y. (1997). Morphological changes in the life cycle of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, *84*(1), 94–97. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)82794-8](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)82794-8)
- Koller, M., Muhr, A., & Braunegg, G. (2014). Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Research*, *6*, 52–63. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.09.002>
- Kurniawan, S. B., Ahmad, A., Imron, M. F., Abdullah, S. R. S., Othman, A. R., & Hasan, H. A. (2022). Potential of microalgae cultivation using nutrient-rich wastewater and harvesting performance by biocoagulants/bioflocculants: Mechanism, multi-conversion of biomass into valuable products, and future challenges. *Journal of Cleaner Production*, *365*, 132806. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.132806>
- Lamers, P. P., van de Laak, C. C. W., Kaasenbrood, P. S., Lorier, J., Janssen, M., De Vos, R. C. H., Bino, R. J., & Wijffels, R. H. (2010). Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed *Dunaliella salina*. *Biotechnology and Bioengineering*, *106*(4), 638–648. <https://doi.org/10.1002/bit.22725>
- Langi, P., Kiokias, S., Varzakas, T., & Proestos, C. (2018). Carotenoids: From Plants to Food and Feed Industries. In C. Barreiro & J.-L. Barredo (Eds.), *Microbial Carotenoids: Methods and Protocols* (pp. 57–71). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8742-9_3
- Lari, Z., Ahmadzadeh, H., & Hosseini, M. (2019). Chapter 2 - Cell Wall Disruption: A Critical Upstream Process for Biofuel Production. In M. Hosseini (Ed.), *Advances in Feedstock Conversion Technologies for Alternative Fuels and Bioproducts* (pp.

-
- 21–35). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817937-6.00002-3>
- Lei, A., Chen, H., Shen, G., Hu, Z., Chen, L., & Wang, J. (2012). Expression of fatty acid synthesis genes and fatty acid accumulation in *haematococcus pluvialis* under different stressors. *Biotechnology for Biofuels*, 5(1), 18. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-18>
- Lemoine, Y., & Schoefs, B. (2010). Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: A multifunctional response to stress. *Photosynthesis Research*, 106(1–2), 155–177. <https://doi.org/10.1007/s11120-010-9583-3>
- Leya, T. (2013). Snow Algae: Adaptation Strategies to Survive on Snow and Ice. In J. Seckbach, A. Oren, & H. Stan-Lotter (Eds.), *Polyextremophiles: Life Under Multiple Forms of Stress* (pp. 401–423). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6488-0_17
- Leya, T. (2020). The CCCryo Culture Collection of Cryophilic Algae as a valuable bioresource for algal biodiversity and for novel, industrially marketable metabolites. *Applied Phycology*, 1–22. <https://doi.org/10.1080/26388081.2020.1753572>
- Leya, T., Rahn, A., Lätz, C., & Remias, D. (2009). Response of arctic snow and permafrost algae to high light and nitrogen stress by changes in pigment composition and applied aspects for biotechnology: Pigment change in snow algae. *FEMS Microbiology Ecology*, 67(3), 432–443. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00641.x>

-
- Li, Y., Miao, F., Geng, Y., Lu, D., Zhang, C., & Zeng, M. (2012). Accurate quantification of astaxanthin from *Haematococcus* crude extract spectrophotometrically. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 30(4), 627–637. <https://doi.org/10.1007/s00343-012-1217-5>
- Liang, M.-H., Xie, S.-R., Dai, J.-L., Chen, H.-H., & Jiang, J.-G. (2023). Roles of Two Phytoene Synthases and Orange Protein in Carotenoid Metabolism of the β -Carotene-Accumulating *Dunaliella salina*. *Microbiology Spectrum*, 0(0), e00069-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00069-23>
- Lichtenthaler, H. K., & Buschmann, C. (2001). Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Food Analytical Chemistry*, F4.3.1-F4.3.8.
- Liu, J., Huang, J., Sun, Z., Zhong, Y., Jiang, Y., & Chen, F. (2011). Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingiensis*: Assessment of algal oils for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 102(1), 106–110. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.017>
- Liu, Y., Liu, X., Cui, Y., & Yuan, W. (2022). Ultrasound for microalgal cell disruption and product extraction: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 87, 106054. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.106054>
- Liyanaarachchi, V. C., Premaratne, M., Ariyadasa, T. U., Nimarshana, P. H. V., & Malik, A. (2021). Two-stage cultivation of microalgae for production of high-value compounds and biofuels: A review. *Algal Research*, 57, 102353. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102353>

-
- Lum, K. K., Kim, J., & Lei, X. G. (2013). Dual potential of microalgae as a sustainable biofuel feedstock and animal feed. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 4(1), 53. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-4-53>
- Lutz, S., Anesio, A. M., Field, K., & Benning, L. G. (2015). Integrated ‘Omics’, Targeted Metabolite and Single-cell Analyses of Arctic Snow Algae Functionality and Adaptability. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01323>
- Lv, H., Cui, X., Wahid, F., Xia, F., Zhong, C., & Jia, S. (2016). Analysis of the Physiological and Molecular Responses of *Dunaliella salina* to Macronutrient Deprivation. *PLOS ONE*, 11(3), e0152226. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152226>
- Maltsev, Y., Maltseva, K., Kulikovskiy, M., & Maltseva, S. (2021). Influence of Light Conditions on Microalgae Growth and Content of Lipids, Carotenoids, and Fatty Acid Composition. *Biology*, 10(10), 1060. <https://doi.org/10.3390/biology10101060>
- Mao, X., Wu, T., Sun, D., Zhang, Z., & Chen, F. (2018). Differential responses of the green microalga *Chlorella zofingiensis* to the starvation of various nutrients for oil and astaxanthin production. *Bioresource Technology*, 249, 791–798. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.090>
- Marinho, Y. F., Malafaia, C. B., de Araújo, K. S., da Silva, T. D., dos Santos, A. P. F., de Moraes, L. B., & Gálvez, A. O. (2021). Evaluation of the influence of different culture media on growth, life cycle, biochemical composition, and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis*. *Aquaculture International*, 29(2), 757–778. <https://doi.org/doi.org/10.1007/s10499-021-00655-z>

-
- Martínez, J. M., Gojkovic, Z., Ferro, L., Maza, M., Álvarez, I., Raso, J., & Funk, C. (2019). Use of pulsed electric field permeabilization to extract astaxanthin from the Nordic microalga *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, *289*, 121694. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121694>
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, Nidia. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *14*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
- Min, K. H., Kim, D. H., Ki, M.-R., & Pack, S. P. (2022). Recent progress in flocculation, dewatering, and drying technologies for microalgae utilization: Scalable and low-cost harvesting process development. *Bioresource Technology*, *344*, 126404. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126404>
- Minhas, A. K., Hodgson, P., Barrow, C. J., & Adholeya, A. (2016). A Review on the Assessment of Stress Conditions for Simultaneous Production of Microalgal Lipids and Carotenoids. *Frontiers in Microbiology*, *7*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00546>
- Misawa, N. (2010). 1.20—Carotenoids. In H.-W. (Ben) Liu & L. Mander (Eds.), *Comprehensive Natural Products II* (pp. 733–753). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00009-5>
- Mobin, S., & Alam, F. (2017). Some Promising Microalgal Species for Commercial Applications: A review. *Energy Procedia*, *110*, 510–517. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.03.177>

- Mohan, S. V., Devi, M. P., Subhash, G. V., & Chandra, R. (2014). Chapter 8—Algae Oils as Fuels. In A. Pandey, D.-J. Lee, Y. Chisti, & C. R. Soccol (Eds.), *Biofuels from Algae* (pp. 155–187). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59558-4.00008-5>
- Molino, A., Rimauro, J., Casella, P., Cerbone, A., Larocca, V., Chianese, S., Karatza, D., Mehariya, S., Ferraro, A., Hristoforou, E., & Musmarra, D. (2018). Extraction of astaxanthin from microalga *Haematococcus pluvialis* in red phase by using generally recognized as safe solvents and accelerated extraction. *Journal of Biotechnology*, *283*, 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.010>
- Mouradi, A., Mouradi, A., Givernaud, T., Akallal, R., & Riyahi, J. (2009). *PRODUCTION DE BIOMASSE ET DE β - CAROTENE PAR DUNALIELLA SALINA CULTIVEE DANS LA SALINE DE TISSA, AU MAROC.*
- Mulders, K. J. M., Janssen, J. H., Martens, D. E., Wijffels, R. H., & Lamers, P. P. (2014). Effect of biomass concentration on secondary carotenoids and triacylglycerol (TAG) accumulation in nitrogen-depleted *Chlorella zofingiensis*. *Algal Research*, *6*, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.08.006>
- Mussagy, C. U., Pereira, J. F. B., Santos-Ebinuma, V. C., Pessoa, A., & Raghavan, V. (2022). Insights into using green and unconventional technologies to recover natural astaxanthin from microbial biomass. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *0(0)*, 1–15. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2093326>
- Narala, R. R., Garg, S., Sharma, K. K., Thomas-Hall, S. R., Deme, M., Li, Y., & Schenk, P. M. (2016). Comparison of Microalgae Cultivation in Photobioreactor, Open Raceway Pond, and a Two-Stage Hybrid System. *Frontiers in Energy Research*, *4*. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2016.00029>

- Nazih, H., & Bard, J.-M. (2018). Chapter 10 - Microalgae in Human Health: Interest as a Functional Food. In I. A. Levine & J. Fleurence (Eds.), *Microalgae in Health and Disease Prevention* (pp. 211–226). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811405-6.00010-4>
- Nguyen, T. T. (2018). *Éco-extraction et encapsulation de pigments caroténoïdes et anthocyanes à partir de plantes tropicales.*
- Ninčević Grassino, A., Rimac Brnčić, S., Badanjak Sabolović, M., Šic Žlabur, J., Marović, R., & Brnčić, M. (2023). Carotenoid Content and Profiles of Pumpkin Products and By-Products. *Molecules*, 28(2), Article 2.
<https://doi.org/10.3390/molecules28020858>
- Novoveská, L., Ross, M. E., Stanley, M. S., Pradelles, R., Wasiolek, V., & Sassi, J.-F. (2019). Microalgal Carotenoids: A Review of Production, Current Markets, Regulations, and Future Direction. *Marine Drugs*, 17(11), 640.
<https://doi.org/10.3390/md17110640>
- Ojha, K. S., Aznar, R., O'Donnell, C., & Tiwari, B. K. (2020). Ultrasound technology for the extraction of biologically active molecules from plant, animal and marine sources. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 122, 115663.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115663>
- Olabi, A. G., Shehata, N., Sayed, E. T., Rodriguez, C., Anyanwu, R. C., Russell, C., & Abdelkareem, M. A. (2023). Role of microalgae in achieving sustainable development goals and circular economy. *Science of The Total Environment*, 854, 158689. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158689>

- Oslan, S. N. H., Shoparwe, N. F., Yusoff, A. H., Rahim, A. A., Chang, C. S., Tan, J. S., Oslan, S. N., Arumugam, K., Ariff, A. B., Sulaiman, A. Z., & Mohamed, M. S. (2021). A Review on *Haematococcus pluvialis* Bioprocess Optimization of Green and Red Stage Culture Conditions for the Production of Natural Astaxanthin. *Biomolecules*, *11*(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/biom11020256>
- Painter, T. H., Duval, B., Thomas, W. H., Mendez, M., Heintzelman, S., & Dozier, J. (2001). Detection and Quantification of Snow Algae with an Airborne Imaging Spectrometer. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(11), 5267–5272. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.11.5267-5272.2001>
- Park, J. C., Choi, S. P., Hong, M.-E., & Sim, S. J. (2014). Enhanced astaxanthin production from microalga, *Haematococcus pluvialis* by two-stage perfusion culture with stepwise light irradiation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *37*(10), 2039–2047. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1180-y>
- Passos, F., Uggetti, E., Carrère, H., & Ferrer, I. (2014). Pretreatment of microalgae to improve biogas production: A review. *Bioresource Technology*, *172*, 403–412. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.114>
- Pelah, D., Sintov, A., & Cohen, E. (2004). The Effect of Salt Stress on the Production of Canthaxanthin and Astaxanthin by *Chlorella zofingiensis* Grown Under Limited Light Intensity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *20*(5), 483–486. <https://doi.org/10.1023/B:WIBI.0000040398.93103.21>
- 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*(1), 11–36. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037>

-
- Peter, A. P., Koyande, A. K., Chew, K. W., Ho, S.-H., Chen, W.-H., Chang, J.-S., Krishnamoorthy, R., Banat, F., & Show, P. L. (2022). Continuous cultivation of microalgae in photobioreactors as a source of renewable energy: Current status and future challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *154*, 111852. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111852>
- Pick, U., Zarka, A., Boussiba, S., & Davidi, L. (2019). A hypothesis about the origin of carotenoid lipid droplets in the green algae *Dunaliella* and *Haematococcus*. *Planta*, *249*(1), 31–47. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-3050-3>
- Polle, J. E. W., Roth, R., Ben-Amotz, A., & Goodenough, U. (2020). Ultrastructure of the green alga *Dunaliella salina* strain CCAP19/18 (Chlorophyta) as investigated by quick-freeze deep-etch electron microscopy. *Algal Research*, *49*, 101953. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101953>
- Poojary, M., Barba, F., Aliakbarian, B., Donsì, F., Pataro, G., Dias, D., & Juliano, P. (2016). Innovative Alternative Technologies to Extract Carotenoids from Microalgae and Seaweeds. *Marine Drugs*, *14*, 214. <https://doi.org/10.3390/md14110214>
- Postma, P. R., Pataro, G., Capitoli, M., Barbosa, M. J., Wijffels, R. H., Eppink, M. H. M., Olivieri, G., & Ferrari, G. (2016). Selective extraction of intracellular components from the microalga *Chlorella vulgaris* by combined pulsed electric field–temperature treatment. *Bioresource Technology*, *203*, 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.012>
- Procházková, L., Remias, D., Řezanka, T., & Nedbalová, L. (2018). *Chloromonas nivalis* subsp. *tatrae*, subsp. nov. (Chlamydomonadales, Chlorophyta): Re-examination

-
- of a snow alga from the High Tatra Mountains (Slovakia). *Fottea*, 18(1), 1–18.
<https://doi.org/10.5507/fot.2017.010>
- Rammuni, M. N., Ariyadasa, T. U., Nimarshana, P. H. V., & Attalage, R. A. (2019). Comparative assessment on the extraction of carotenoids from microalgal sources: Astaxanthin from *H. pluvialis* and β -carotene from *D. salina*. *Food Chemistry*, 277, 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.066>
- Ranjan, A., Patil, C., & Moholkar, V. S. (2010). Mechanistic Assessment of Microalgal Lipid Extraction. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 49(6), 2979–2985.
<https://doi.org/10.1021/ie9016557>
- Raposo, M. F. J., Morais, A. M. M. B., & Morais, R. M. S. C. (2012). Effects of spray-drying and storage on astaxanthin content of *Haematococcus pluvialis* biomass. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 28(3), 1253–1257.
<https://doi.org/10.1007/s11274-011-0929-6>
- Rebelo, B. A., Farrona, S., Ventura, M. R., & Abranches, R. (2020). Canthaxanthin, a Red-Hot Carotenoid: Applications, Synthesis, and Biosynthetic Evolution. *Plants*, 9(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/plants9081039>
- Remias, D. (2012). Cell Structure and Physiology of Alpine Snow and Ice Algae. In C. Lütz (Ed.), *Plants in Alpine Regions* (pp. 175–185). Springer Vienna.
https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0136-0_13
- Remias, D., Karsten, U., Lütz, C., & Leya, T. (2010). Physiological and morphological processes in the Alpine snow alga *Chloromonas nivalis* (Chlorophyceae) during cyst formation. *Protoplasma*, 243(1–4), 73–86. <https://doi.org/10.1007/s00709-010-0123-y>

-
- Remias, D., Lütz-Meindl, U., & Lütz, C. (2005). Photosynthesis, pigments and ultrastructure of the alpine snow alga *Chlamydomonas nivalis*. *European Journal of Phycology*, 40(3), 259–268. <https://doi.org/10.1080/09670260500202148>
- Řezanka, T., Nedbalová, L., Kolouchová, I., & Sigler, K. (2013). LC–MS/APCI identification of glucoside esters and diesters of astaxanthin from the snow alga *Chlamydomonas nivalis* including their optical stereoisomers. *Phytochemistry*, 88, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.01.003>
- Rise, M., Cohen, E., Vishkautsan, M., Cojocaru, M., Gottlieb, H. E., & Arad, S. (Malis). (1994). Accumulation of Secondary Carotenoids in *Chlorella zofingiensis*. *Journal of Plant Physiology*, 144(3), 287–292. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81189-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81189-2)
- Ritu, J. R., Ambati, R. R., Ravishankar, G. A., Shahjahan, M., & Khan, S. (2023). Utilization of astaxanthin from microalgae and carotenoid rich algal biomass as a feed supplement in aquaculture and poultry industry: An overview. *Journal of Applied Phycology*, 35(1), 145–171. <https://doi.org/10.1007/s10811-022-02817-9>
- Saini, R. K., & Keum, Y.-S. (2018). Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chemistry*, 240, 90–103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.099>
- Santos-Ballardo, D. U., Rossi, S., Reyes-Moreno, C., & Valdez-Ortiz, A. (2016). Microalgae potential as a biogas source: Current status, restraints and future trends. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 15(2), 243–264. <https://doi.org/10.1007/s11157-016-9392-z>

- Sanz Smachetti, M., Sanchez Rizza, L., Coronel, C., Do Nascimento, M., & Curatti, L. (2018). *Microalgal Biomass as an Alternative Source of Sugars for the Production of Bioethanol* (pp. 351–386). <https://doi.org/10.1002/9781119460381.ch16>
- Saravanan, A., Senthil Kumar, P., Badawi, M., Mohanakrishna, G., & Aminabhavi, T. M. (2023). Valorization of micro-algae biomass for the development of green biorefinery: Perspectives on techno-economic analysis and the way towards sustainability. *Chemical Engineering Journal*, 453, 139754. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.139754>
- Sathasivam, R., Radhakrishnan, R., Kim, J. K., & Park, S. U. (2021). An update on biosynthesis and regulation of carotenoids in plants. *South African Journal of Botany*, 140, 290–302. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.05.015>
- Savy, S. (2005). *Biosynthèse de caroténoïdes aromatiques hydroxylés par des bactéries non photosynthétiques: Des carotènes aux xanthophylles*.
- Schoch, C. L., Ciufo, S., Domrachev, M., Hottton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., Mcveigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S., & Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: A comprehensive update on curation, resources and tools. *Database*, 2020, baaa062. <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>
- Schoefs, B., Rmiki, N.-E., Rachadi, J., & Lemoine, Y. (2001). Astaxanthin accumulation in *Haematococcus* requires a cytochrome P450 hydroxylase and an active synthesis of fatty acids. *FEBS Letters*, 500(3), 125–128. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02596-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02596-0)

-
- Scibilia, L., Girolomoni, L., Berteotti, S., Alboresi, A., & Ballottari, M. (2015). Photosynthetic response to nitrogen starvation and high light in *Haematococcus pluvialis*. *Algal Research*, 12, 170–181. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.08.024>
- Sedjati, S., Santosa, G., Yudiati, E., Supriyantini, E., Ridlo, A., & Kimberly, F. (2019). Chlorophyll and Carotenoid Content of *Dunaliella salina* at Various Salinity Stress and Harvesting Time. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 246, 012025. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/246/1/012025>
- Seely, G. R., Duncan, M. J., & Vidaver, W. E. (1972). Preparative and analytical extraction of pigments from brown algae with dimethyl sulfoxide. *Marine Biology*, 12(2), 184–188. <https://doi.org/10.1007/BF00350754>
- Shah, M. R., Lutz, G. A., Alam, A., Sarker, P., Kabir Chowdhury, M. A., Parsaeimehr, A., Liang, Y., & Daroch, M. (2018). Microalgae in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry. *Journal of Applied Phycology*, 30(1), 197–213. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1234-z>
- Shin, H., Lee, S., Suk Jung, H., & Kim, J.-B. (2013). Effect of ball size and powder loading on the milling efficiency of a laboratory-scale wet ball mill. *Ceramics International*, 39(8), 8963–8968. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2013.04.093>
- Show, K.-Y., Lee, D.-J., Tay, J.-H., Lee, T.-M., & Chang, J.-S. (2015). Microalgal drying and cell disruption – Recent advances. *Bioresour. Technol.*, 184, 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.139>

- Sivaramakrishnan, R., & Incharoensakdi, A. (2018). Microalgae as feedstock for biodiesel production under ultrasound treatment – A review. *Bioresource Technology*, 250, 877–887. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.095>
- Spain, O., & Funk, C. (2022). Detailed Characterization of the Cell Wall Structure and Composition of Nordic Green Microalgae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(31), 9711–9721. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c02783>
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87–96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Su, F., Xu, H., Yang, N., Liu, W., & Liu, J. (2018). Hydrolytic efficiency and isomerization during de-esterification of natural astaxanthin esters by saponification and enzymolysis. *Electronic Journal of Biotechnology*, 34, 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2018.05.002>
- Sui, Y., & Vlaeminck, S. E. (2020). Dunaliella Microalgae for Nutritional Protein: An Undervalued Asset. *Trends in Biotechnology*, 38(1), 10–12. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.07.011>
- Sun, H., Liu, B., Lu, X., Cheng, K.-W., & Chen, F. (2017). Staged cultivation enhances biomass accumulation in the green growth phase of *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 233, 326–331. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.011>
- SundarRajan, P., Gopinath, K. P., Greetham, D., & Antonysamy, A. J. (2019). A review on cleaner production of biofuel feedstock from integrated CO₂ sequestration and

-
- wastewater treatment system. *Journal of Cleaner Production*, 210, 445–458.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.11.010>
- Świątkiewicz, S., Arczewska-Włosek, A., & Józefiak, D. (2015). Application of microalgae biomass in poultry nutrition. *World's Poultry Science Journal*, 71(4), 663–672.
<https://doi.org/10.1017/S0043933915002457>
- Takaichi, S. (2020). Carotenoids in Phototrophic Microalgae: Distributions and Biosynthesis. In E. Jacob-Lopes, M. I. Queiroz, & L. Q. Zepka (Eds.), *Pigments from Microalgae Handbook* (pp. 19–41). Springer International Publishing.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-50971-2_2
- Tan, J. S., Lee, S. Y., Chew, K. W., Lam, M. K., Lim, J. W., Ho, S.-H., & Show, P. L. (2020). A review on microalgae cultivation and harvesting, and their biomass extraction processing using ionic liquids. *Bioengineered*, 11(1), 116–129.
<https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1711626>
- Tebbani, S., Filali, R., Dumur, D., Lopes, F., & Pareau, D. (2014). *Biofixation de CO2 par les microalgues: Modélisation, estimation et commande*. ISTE Group.
- Tiron, O., Bumbac, C., Manea, E., Stefanescu, M., & Nita Lazar, M. (2017). Overcoming Microalgae Harvesting Barrier by Activated Algae Granules. *Scientific Reports*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05027-3>
- Ugwu, C. U., Aoyagi, H., & Uchiyama, H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, 99(10), 4021–4028.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.046>

- Varshney, P., Mikulic, P., Vonshak, A., Beardall, J., & Wangikar, P. P. (2015). Extremophilic micro-algae and their potential contribution in biotechnology. *Bioresource Technology*, *184*, 363–372. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.040>
- Vaz, B. da S., Moreira, J. B., Morais, M. G. de, & Costa, J. A. V. (2016). Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements. *Current Opinion in Food Science*, *7*, 73–77. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.12.006>
- Vázquez-Romero, B., Perales, J. A., Pereira, H., Barbosa, M., & Ruiz, J. (2022). Techno-economic assessment of microalgae production, harvesting and drying for food, feed, cosmetics, and agriculture. *Science of The Total Environment*, *837*, 155742. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155742>
- Vítová, M. (2020). *Microalgae: From Physiology to Application*. BoD – Books on Demand.
- Wang, S., Meng, Y., Liu, J., Cao, X., & Xue, S. (2018). Accurate quantification of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using DMSO extraction and lipase-catalyzed hydrolysis pretreatment. *Algal Research*, *35*, 427–431. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.08.029>
- Wang, S.-K., Stiles, A. R., Guo, C., & Liu, C.-Z. (2014). Microalgae cultivation in photobioreactors: An overview of light characteristics. *Engineering in Life Sciences*, *14*(6), 550–559. <https://doi.org/10.1002/elsc.201300170>
- Wayama, M., Ota, S., Matsuura, H., Nango, N., Hirata, A., & Kawano, S. (2013). Three-Dimensional Ultrastructural Study of Oil and Astaxanthin Accumulation during Encystment in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *PLOS ONE*, *8*(1), e53618. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053618>

- Wellburn, A. R. (1994). The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144(3), 307–313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)
- Wen, Z., Liu, Z., Hou, Y., Liu, C., Gao, F., Zheng, Y., & Chen, F. (2015). Ethanol induced astaxanthin accumulation and transcriptional expression of carotenogenic genes in *Haematococcus pluvialis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 78, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.06.010>
- Yaakob, M. A., Mohamed, R. M. S. R., Al-Gheethi, A., Aswathnarayana Gokare, R., & Ambati, R. R. (2021). Influence of Nitrogen and Phosphorus on Microalgal Growth, Biomass, Lipid, and Fatty Acid Production: An Overview. *Cells*, 10(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/cells10020393>
- Yaqoob, S., Riaz, M., Shabbir, A., Zia-Ul-Haq, M., Alwakeel, S. S., & Bin-Jumah, M. (2021). Commercialization and Marketing Potential of Carotenoids. In M. Zia-Ul-Haq, S. Dewanjee, & M. Riaz (Eds.), *Carotenoids: Structure and Function in the Human Body* (pp. 799–826). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-46459-2_27
- Ye, Z.-W., Jiang, J.-G., & Wu, G.-H. (2008). Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: Progresses and prospects. *Biotechnology Advances*, 26(4), 352–360. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.03.004>
- Yuan, J.-P., & Chen, F. (1998). Chromatographic Separation and Purification of *trans* - Astaxanthin from the Extracts of *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(8), 3371–3375. <https://doi.org/10.1021/jf980039b>

-
- Zarandi-Miandoab, L., Hejazi, M.-A., Bagherieh-Najjar, M.-B., & Chaparzadeh, N. (2019). Optimization of the Four Most Effective Factors on β -Carotene Production by *Dunaliella salina* Using Response Surface Methodology. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR*, 18(3), 1566–1579. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2019.1100752>
- Zarekarizi, A., Hoffmann, L., & Burritt, D. J. (2023). The potential of manipulating light for the commercial production of carotenoids from algae. *Algal Research*, 71, 103047. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103047>
- Zhang, B. Y., Geng, Y. H., Li, Z. K., Hu, H. J., & Li, Y. G. (2009). Production of astaxanthin from *Haematococcus* in open pond by two-stage growth one-step process. *Aquaculture*, 295(3), 275–281. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.06.043>
- Zhang, C., Lyu, X., Arshad, R. N., Aadil, R. M., Tong, Y., Zhao, W., & Yang, R. (2023). Pulsed electric field as a promising technology for solid foods processing: A review. *Food Chemistry*, 403, 134367. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134367>
- Zhang, H. Q., Barbosa-Cánovas, G. V., Balasubramaniam, V. M. B., Dunne, C. P., Farkas, D. F., & Yuan, J. T. C. (2011). *Nonthermal Processing Technologies for Food*. John Wiley & Sons.
- Zhang, R., Lebovka, N., Marchal, L., Vorobiev, E., & Grimi, N. (2020). Pulsed electric energy and ultrasonication assisted green solvent extraction of bio-molecules from different microalgal species. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 62, 102358. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102358>

-
- Zhang, Z., Sun, D., Wu, T., Li, Y., Lee, Y., Liu, J., & Chen, F. (2017). The synergistic energy and carbon metabolism under mixotrophic cultivation reveals the coordination between photosynthesis and aerobic respiration in *Chlorella zofingiensis*. *Algal Research*, 25, 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.05.007>
- Zhang, Z., Sun, D., Zhang, Y., & Chen, F. (2019). Glucose triggers cell structure changes and regulates astaxanthin biosynthesis in *Chromochloris zofingiensis*. *Algal Research*, 39, 101455. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101455>
- Zhao, L., Zhao, G., Chen, F., Wang, Z., Wu, J., & Hu, X. (2006). Different Effects of Microwave and Ultrasound on the Stability of (*all—E*)-Astaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(21), 8346–8351. <https://doi.org/10.1021/jf061876d>
- Zhu, S., Wang, Y., Shang, C., Wang, Z., Xu, J., & Yuan, Z. (2015). Characterization of lipid and fatty acids composition of *Chlorella zofingiensis* in response to nitrogen starvation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 120(2), 205–209. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.12.018>
- Zuccaro, G., Yousuf, A., Pollio, A., & Steyer, J.-P. (2020). Chapter 2—Microalgae Cultivation Systems. In A. Yousuf (Ed.), *Microalgae Cultivation for Biofuels Production* (pp. 11–29). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817536-1.00002-3>

Liste des figures

- Figure 1** : Structure chimique de certains caroténoïdes (xanthophylles et carotènes). 18
- Figure 2** : Représentation des voies de biosynthèse des caroténoïdes par les microalgues inspiré de (Foong et al., 2021; Gupta et al., 2021). 23
- Figure 3** : Phylums des microalgues productrices de pigments d'intérêt (Mulders et al., 2014). 25
- Figure 4** : Organites présents dans une cellule microalgale typique (Poojary et al., 2016). 26
- Figure 5** : Différentes utilisations des microalgues et de leurs produits dérivés. 28
- Figure 6** : Les stades cellulaires de la microalgue *H.pluvialis* (Marinho et al., 2021). a) zoospores, b) palmela, c) palmela en transition vers les aplanospores, d) aplanospores rouge, e) sporangiums, f) sporangium au stade final, g) zoospores relargués. 30
- Figure 7** : Cellules d'une souche de *D. salina* (CCAP 19/18) observées au microscope optique par Polle et al., (2020). **A**) cellules vertes, **B**) cellules oranges. Les flèches indiquent les pyrénoides. 31
- Figure 8** : Morphologie des cellules de la microalgue *Chlorella zofingiensis*. A) cellules vertes, B) cellules rouges. Échelle de 5 µm. Photographie de (Gorgich et al., 2021). 32
- Figure 9** : Photographies de champs de neiges de différentes teintes causées par des microalgues. (a) Neige verte *Chloromonas brevispina*, (b) Neige brune dorée, *Hydrurus sp.* (c) Neige orange, *Sanguina aurantia* (d) Neige rose, *Chlainomonas kolii* (e) Neige rouge, *Sanguina nivaloides* (f) Glacier gris, *Mesotaenium berggrenii* (Hoham & Remias, 2020). 33
- Figure 10** : Observation au microscope optique d'un spore de *Chlainomonas nivalis* (à gauche) et de *Chloromonas nivalis* (à droite) (Procházková et al., 2018; Remias et al., 2010). 35
- Figure 11** : Stratégie en deux étapes de culture adoptée pour la production d'astaxanthine. 39
- Figure 12** : Différents systèmes de culture des microalgues. (a) Bassin ouvert de type "raceway", (b) bassin circulaire, (c) PBR tubulaire horizontal, (d) PBR airlift, (e) PBR panneau plat, (f) système hybride, bassin ouvert "raceway" avec des PBR tubulaires horizontaux (Sanz Smachetti et al., 2018). 41
- Figure 13** : Photobioréacteurs tubulaires de la culture d'*H.pluvialis* pour la production d'astaxanthine à grande échelle par l'entreprise Algatech (www.algatech.com). 45
- Figure 14** : Culture en bassins ouverts, lagune artificielle de Hutt Lagoon en Australie de *D.salina* pour la production du bêta-carotène (Bodenes, 2017). 46
- Figure 15** : Schéma illustrant l'effet de traitement par CEP et par broyage sur la paroi de *Chlorella vulgaris* (Postma et al., 2016). 50
- Figure 16** : Effet schématique des ultrasons sur les parois de microalgue (Y. Liu et al., 2022). 51

- Figure 17** : Images satellites indiquant les lieux où les souches psychrophiles ont été isolées (Spitzberg, Svalbard, Norvège). La souche *Pleurastrum sp.* a été trouvée dans la région de Ny-Ålesund, illustrée à gauche, tandis que la souche *Sphaerocystis sp.* a été localisée dans la zone maritime de Kongsfjorden, représentée à droite. 57
- Figure 18** : Modèles de broyeurs à bille : à droite le modèle RETCH Mixer MM 400, et à gauche le modèle MP Biomedicals FastPrep-24 TM 5G. 62
- Figure 19** : Photo de l'ultrasonicateur (UP-400S, Hielscher GmbH) 63
- Figure 20** : Photo du générateur des champs électriques pulsés (Basis power electronics) à gauche, avec sa chambre cylindrique de traitement à droite. 64
- Figure 21** : Courbe d'étalonnage de l'astaxanthine pure pour la quantification par HPLC-UV. 66
- Figure 22** : Courbes d'étalonnage d'astaxanthine standard préparé dans le DMSO, pour la quantification par la méthode spectrophotométrique. 67
- Figure 23** : Diagramme illustrant les combinaisons opératoires pour étudier l'effet des paramètres sur la croissance de *Sphaerocystis sp.* et de *Pleurastrum sp.* durant la phase verte. 71
- Figure 24** : Suivi des paramètres de croissance de *Pleurastrum sp.*: l'évolution de MS (●) et de la concentration des nutriments NO_3^- (●), PO_4^{3-} (●), et SO_4^{2-} (●), dans le milieu de culture en fonction du temps. Les barres d'erreur indiquent les écart types entre les duplicatas. 72
- Figure 25** : Suivi de la croissance de *Sphaerocystis sp.*: évolution de la MS (●), de la DO (●) et de la concentration en nutriments NO_3^- (●), PO_4^{3-} (●), et SO_4^{2-} (●), dans le milieu de culture en fonction du temps. Les barres d'erreur indiquent les écart types entre les duplicatas. 73
- Figure 26** : À gauche : photographie de *Pleurastrum sp.* cultivée en fiole Erlenmeyer, et observation au microscope optique (x400) révélant un flocc composé de « caenoblastes ». À droite : photographie de *Sphaerocystis sp.* cultivée en fiole Erlenmeyer, et observation au microscope optique (x400) montrant différentes formes cellulaires. Les flèches noires indiquent des cellules présentant une forme dite « en fleur ». 74
- Figure 27** : Courbes de croissance de *Pleurastrum sp.* dans les conditions opératoires C et F et en fonction du temps. Les barres d'erreur indiquent les écart types entre les triplicatas. 76
- Figure 28** : Courbes de suivi des concentrations des nutriments lors de la croissance de *Pleurastrum sp.* en fonction des conditions opératoires C et F et en fonction du temps. 77
- Figure 29** : Courbes de croissance de *Pleurastrum sp.* dans les conditions opératoires A, B et C et en fonction du temps. Les barres d'erreur indiquent les écart types entre les triplicatas. 78
- Figure 30** : Courbes de suivi des concentrations des nutriments lors de la croissance de *Pleurastrum sp.* en fonction des conditions opératoires A, B et C et en fonction du temps. 79
- Figure 31** : Courbes de croissance de *Pleurastrum sp.* dans les conditions C, D et E en fonction du temps. Les barres d'erreur indiquent les écart-types entre les triplicatas 80

- Figure 32** : Courbes de suivi des concentrations des nutriments lors de la croissance de *Pleurastrum sp.* en fonction des conditions opératoires C, D et E et en fonction du temps 81
- Figure 33** : Courbes de croissance de *Sphaerocystis sp.* en fonction des conditions opératoires. Les barres d'erreur indiquent les écart-types entre les triplicatas. 82
- Figure 34** : Courbes de suivi des concentrations des nutriments lors de la croissance de *Sphaerocystis sp.* en fonction des conditions opératoires C et F en fonction du temps 83
- Figure 35** : Courbes de croissance de *Sphaerocystis sp.* en fonction des conditions opératoires. Les barres d'erreur indiquent les écart-types entre les triplicatas 84
- Figure 36** : Courbes de suivi des concentrations des nutriments lors de la croissance de *Sphaerocystis sp.* en fonction des conditions opératoires A, B et C en fonction du temps. 85
- Figure 37** : Courbes de croissance de *Sphaerocystis sp.* en fonction des conditions opératoires. Les barres d'erreur indiquent les écart-types entre les triplicatas 87
- Figure 38** : Courbes de suivi des concentrations des nutriments lors de la croissance de *Sphaerocystis sp.* en fonction des conditions opératoires. 88
- Figure 39** : Schéma du photo-bioréacteur de type colonne à bulles à double enveloppe utilisé 92
- Figure 40** : Suivi de croissance de *Pleurastrum sp.* en PBR pendant 4 mois en mode Fed Batch par la DO (●) et la MS (●). Les barres d'erreur indiquent les écart-types des triplicatas 93
- Figure 41** : a) *Pleurastrum sp.* en PBR sous trois formes, en biofilm, en suspensions et en floccs. b) Observations microscopiques (x400) de la culture de *Pleurastrum sp.* en PBR. A) Un flocc de cellules observé après 71 jours de culture, B) Un flocc de cellules observé après 91 jours au grossissement X1000, C) Cellules en suspension observées après 72 jours, et D) Cellules en suspension observées après 104 jours. 94
- Figure 42** : Concentration en nitrate (●), phosphate (▲) et sulfate (▪) dans le PBR en fed-batch avec *Pleurastrum sp.*. Des réalimentations régulières sont montrées en flèches noires. 95
- Figure 43** : Vitesses de consommation en nitrate (●), en phosphate (●) et en sulfate (●), calculées entre chaque réalimentation au cours de la culture dans le PBR de *Pleurastrum sp.* 96
- Figure 44** : Teneurs en pigments des cultures vertes de *Pleurastrum sp.* récoltées du PBR dans le milieu B3N, sur uniquement les floccs (●) et sur la culture homogène de floccs et de cellules en suspension (●). Ces cultures représentent l'état initial du test de stress avec cette souche. Les barres d'erreur indiquent les écarts-types entre les triplicatas. 96
- Figure 45** : Schéma de la méthode d'étude préliminaire de la phase rouge avec *Pleurastrum sp.* 97
- Figure 46** : Photographies des cultures de *Pleurastrum sp.* au 1er et 24ème jours de stress. A : floccs et cellules en suspension dans du BBM-N+NaCl, B : floccs et cellules en suspension en carence naturelle, C : floccs dans du BBM-N, D : floccs dans du BBM-N+NaCl, E : floccs dans du BBM-P, F : floccs dans du BBM (témoin). 98

- Figure 47** : Photographies obtenues par microscope optique (x400) de *Pleurastrum sp.* après 24 jours de culture en phase rouge. A : floccs et cellules en suspension dans du BBM-N+NaCl, B : floccs et cellules en suspension en carence naturelle, C : floccs dans du BBM-N, D : floccs dans du BBM-N+NaCl, E : floccs dans du BBM-P, F : floccs dans du BBM (témoin). 99
- Figure 48** : Teneurs en pigments des cultures de *Pleurastrum sp.* après 24 jours de stress. Cultures des floccs et des cellules en suspension en milieu BBM-N+NaCl (●), et en carence naturelle du milieu B3N issu du PBR (●), Culture de floccs seuls en milieux BBM-N (●), BBM-N+NaCl (●), BBM-P (●) et BBM (●). 100
- Figure 49** : Photographies des floccs de *Pleurastrum sp.* dans des fioles Erlenmeyers sous diverses conditions de stress ont été prises à l'état initial (phase verte) et à l'état final du stress après 21 jours (phase rouge). 103
- Figure 50** : Photographies obtenues par microscope optique (x400) de *Pleurastrum sp.* après 21 jours de culture en phase rouge. J1 : Floccs issus du PBR le jour 1 représentant l'état initial en phase verte/début du stress. A: BBM (témoin), B: BBM-N, C: BBM-P, D: BBM-N-P, E: BBM+NaCl, F: BBM+NaCl-N, G: BBM+NaCl-P et H: BBM+NaCl-N-P. 103
- Figure 51** : a) Teneurs en chlorophylles et caroténoïdes totaux, b) Teneurs en caroténoïdes des cultures de *Pleurastrum sp.* après 21 jours de stress (état final). A: BBM (témoin), B: BBM-N, C: BBM-P, D: BBM-N-P, E: BBM+NaCl, F: BBM+NaCl-N, G: BBM+NaCl-P et H: BBM+NaCl-N-P. Viol : violaxanthine, Lut : lutéine, Zea :zéaxanthine, Cant :canthaxanthine. Les barres d'erreur indiquent les écarts-types entre les triplicatas. 104
- Figure 52** : Photographies de *Sphaerocystis sp.* dans des fioles Erlenmeyers sous quelques conditions de stress ont été prises à trois moments différents : à l'état initial en phase verte, au 7ème jour de stress (état intermédiaire), et à la fin du stress au 14ème jours (état final). 106
- Figure 53** : Photographies obtenues par microscope optique (x400) de *Sphaerocystis sp.* après 14 jours de culture en phase rouge. A : cellules à l'état initial (phase verte/début de phase rouge) dans le milieu BBM, D : cellules dans le milieu D de BBM-N-P, F : cellules dans le milieu de BBM+NaCl-N. 107
- Figure 54** : Teneurs en chlorophylles et caroténoïdes totaux des cultures de *Sphaerocystis sp.* en phase verte GP (état initial au début du stress), et après deux semaines de stress de la phase rouge (état final) sous les conditions : A: BBM (témoin), B: BBM-N, D: BBM-N-P, F: BBM+NaCl-N, et H: BBM+NaCl-N-P. 108
- Figure 55** : Suivi de la croissance de *Sphaerocystis sp.* en TAP (●), BNH4 (●) et B3N (●) pendant la phase verte et la phase rouge. Les phases sont séparées par un trait vertical rouge. Les barres d'erreur indiquent les écarts types entre les triplicatas. 110
- Figure 56** : Suivi de croissance de la répétition de culture de *Sphaerocystis sp.* par la DO en TAP (●) et BNH4 (●) et par la MS en TAP (●) et BNH4 (●) pendant la phase verte et la phase rouge. Les phases sont séparées par un trait vertical rouge. 110

- Figure 57** : Suivi de la concentration en azote dans la culture de *Sphaerocystis sp.* en TAP (●), BNH4 (●) et B3N (●) pendant la phase verte. Les barres d'erreur indiquent les écarts types entre les triplicatas. 112
- Figure 58** : Suivi de consommation en azote des répétitions de culture de *Sphaerocystis sp.* en TAP (●) et BNH4 (●). Les phases sont séparées par un trait vertical rouge, et les barres d'erreur indiquent les écarts types entre les triplicatas. 112
- Figure 59** : Teneurs en pigments à la fin de la phase rouge avec *Sphaerocystis sp.* en TAP, BNH4 et B3N comparés aux résultats de T. Leya sur une souche similaire CCCryo 101-99. 113
- Figure 60** : Teneur en pigments obtenues à la fin de la phase rouge des cultures de *Sphaerocystis sp.* en milieu BNH4 comparant la première et la deuxième expérience. 113
- Figure 61** : Photographie du photo-bioréacteur de la culture de *Sphaerocystis sp.*, ainsi que l'observation des cellules au microscope optique (X400) au début du stress (photo à gauche), et à la fin du stress (photo à droite). 115
- Figure 62** : Suivi de la croissance de *Sphaerocystis sp.* dans le milieu BBM en PBR pendant 88 jours, par la DO à 800 nm et la MS. Les flèches noires indiquent les réalimentations. Les barres d'erreur des MS indiquent les écarts types entre triplicatas. 116
- Figure 63** : Vitesse de consommation en nitrate calculée entre chaque réalimentation au cours de la culture en PBR de *Sphaerocystis sp.* en BBM en mode Fed Batch. 116
- Figure 64** : Suivi des teneurs en pigments produit par *Sphaerocystis sp.*, dosés par la méthode HPLC-UV dans le PBR pendant 88 jours. a) caroténoïdes secondaires. b) chlorophylles et lutéine. Les barres d'erreur des MS indiquent les écarts types entre triplicatas. 117
- Figure 65** : Suivi des teneurs en caroténoïdes produit par *Sphaerocystis sp.*, dosés par la méthode HPLC-UV dans le PBR pendant 88 jours. 118
- Figure 66** : Teneurs en acide gras de la culture de *Pleurastrum sp.* à la fin de la phase verte (●) et rouge (●) et de la culture de *Sphaerocystis sp.* à la fin de la phase verte (●) et rouge (●). 120
- Figure 67** : Schéma général des étapes expérimentales 125
- Figure 68** : Cinétique d'extraction des caroténoïdes en équivalent d'astaxanthine (A) et les rendements en % (B) en fonction du temps d'extraction et selon le solvant utilisé. Les barres d'erreur indiquent les écarts types entre les duplicatas. 127
- Figure 69** : Observations microscopiques au grossissement X1000 des kystes d'*H.pluvialis*, avant prétraitement (à gauche), après les prétraitements physiques (au milieu) et après l'extraction avec l'éthanol (à droite). 128
- Figure 70** : Effet du prétraitement US et CEP sur le rendement d'extraction des caroténoïdes R en %, (A) en fonction d'énergie spécifique en kJ/kg et (B) en fonction du temps en minutes. 129

-
- Figure 71** : Résultats d'extraction des caroténoïdes à partir de *Sphaerocystis sp.* par trois méthodes assistées, US, CEP et broyage à bille au DMSO et une méthode d'extraction au DMSO. (A) teneur de caroténoïdes totaux et (B) rendement d'extraction des caroténoïdes. 131
- Figure 72** : Effet des prétraitements US et CEP sur le rendement d'extraction des caroténoïdes R en % de *Sphaerocystis sp.* (énergie spécifique environ 1300 kJ/kg). 132
- Figure 73** : Teneur en caroténoïdes totaux extraits de *Pleurastrum sp.* dans le DMSO sans ou après broyage à bille 132
- Figure 74** : Densitogramme de la séparation des caroténoïdes secondaires par la méthode HPTLC, l'absorbance à 256 nm en fonction de la distance de migration (Rf rapport frontal) pour *H.pluvialis* (H.p), *Sphaerocystis sp.* (S.sp) et *Pleurastrum sp.* (P.sp). 133
- Figure 75** : Les deux voies de biosynthèse de l'astaxanthine suggérées pour les microalgues étudiées : *H.pluvialis*, *Sphaerocystis sp.* et *Pleurastrum sp.* 135

Liste des tableaux

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des caroténoïdes à grande valeur ajoutée d'origine microalgale et de leurs principaux effets bénéfiques sur la santé, adapté de (Ampofo & Abbey, 2022; Bhalamurugan et al., 2018; Rebelo et al., 2020; Zarekarizi et al., 2023).	20
Tableau 2 : Tableau comparatif entre les caroténoïdes naturels et synthétiques.	24
Tableau 3 : Composition des parois extracellulaires et des macromolécules dans divers groupes de microalgues (Santos-Ballardo et al., 2016).	26
Tableau 4 : Composition biochimique de certaines espèces de microalgues, tableau adapté de (Kandasamy et al., 2022).	27
Tableau 5 : Production annuelle, entreprises et pays producteurs des quatre principales microalgues : <i>Spirulina</i> sp., <i>Chlorella</i> sp., <i>D.salina</i> et <i>H.pluvialis</i> (Olabi et al., 2023).	29
Tableau 6 : Accumulation des caroténoïdes sous diverses conditions de stress.	40
Tableau 7 : Classification des microalgues psychrophiles établie dans la base de données NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Schoch et al., 2020).	56
Tableau 8 : Composition des solutions stocks utilisées pour la formulation des milieux dérivés du BBM (B3N et BNH4).	58
Tableau 9 : Composition des milieux de cultures : BBM, B3N et BNH4, en mL de solutions stock pour 1 L de milieu.	59
Tableau 10 : Composition de 1 L de milieu de culture TAP.	59
Tableau 11 ; Équations de (Lichtenthaler & Buschmann, (2001) et de Wellburn, (1994) utilisées pour calculer la concentration des chlorophylles a et b, et des caroténoïdes totaux.	66
Tableau 12 : Les six combinaisons de conditions opératoires, de A à F, étudiées pour améliorer la croissance des deux microalgues psychrophiles. B : bicarbonate de sodium.	71
Tableau 13 : Suivi de la croissance de <i>Pleurastrum</i> sp. en fonction des conditions opératoires	75
Tableau 14 : Suivi de la croissance de <i>Sphaerocystis</i> sp. en fonction des conditions opératoires.	82
Tableau 15 : Composition des milieux de culture dérivés du BBM pour l'induction du stress lors de la phase rouge. (A) : Ajouté, (NA) : Non-Ajouté, (*) : solution de NaCl à 6 g/L. (N) : Nitrate, (P) : Phosphate, (S) : Sel.	91
Tableau 16 : Couleur des cultures de <i>Pleurastrum</i> sp. observée sous les 8 différentes conditions de stress, après la 1 ^{ère} et 3 ^{ème} semaine de stress.	102
Tableau 17 : Couleur des cultures de <i>Sphaerocystis</i> sp. observée sous les cinq différentes conditions de stress, après la 1 ^{ère} et 2 ^{ème} semaine de stress.	107

Tableau 18 : Teneurs en pigments de *Sphaerocystis sp.* (*S.sp*) et de *Pleurastrum sp.* (*P.sp*) en phase rouge, provenant de la culture en PBRs. (-). Les écarts-types indiqués sont basés sur des mesures effectuées en triplicatas. 119

Tableau 19 : Liste des acides gras déterminés de manière qualitative par la méthode GC chez les deux souches psychrophiles. 121

Tableau 20 : Teneurs maximales en pigments des trois microalgues *H.pluvialis*, *Sphaerocystis sp.* et *Pleurastrum sp.*, obtenu par le broyage à billes. (-) : pigment non détecté, Car.Tot : caroténoïdes totaux, Car.Sec: caroténoïdes secondaires, Ast : astaxanthine, Lut : lutéine, Zéa : zéaxanthine, Vio : violaxanthine, Adx : adonixanthine, Can : canthaxanthine, Chl a : chlorophylle a, Chl b : chlorophylle b. 134

Annexe 2 : Fiche descriptive de la souche psychrophile *Sphaerocystis* sp.

Culture Collection CCCr_o of Cryophilic Algae		Culture Collection of Cryophilic Algae - StrainInfos		 Fraunhofer IZI-BB	
CCCryo 100-99					
cf. <i>Sphaerocystis</i>		sp.		CHODAT	
ssp.		var.		fo.	
Formerly Called		Identical Strains			
Strain History		Authentic Strain <input type="checkbox"/> Type Strain <input type="checkbox"/> Holotype <input type="checkbox"/> Isotype <input type="checkbox"/> Paratype <input type="checkbox"/>			
Special Properties		produces secondary carotenoids			
Publications					
Culture Infos					
Medium 3N BBM pH 5.5 Ag		Culture Temp 2 °C		unialgal <input checked="" type="radio"/> yes <input type="radio"/> no	
Tmax 18 °C		Topt 14 °C		axenic <input type="checkbox"/> yes	
Tmin °C		Temperature Classification psychrophilic		colony pick <input type="radio"/> yes <input type="radio"/> no	
				clonal <input checked="" type="radio"/> yes <input type="radio"/> no	
Taxonomy * Literature		Locality		Geographic Details	
Genus <i>Sphaerocystis</i>		moss fields along snow melt river downstream on sea terraces below		between Hjellen (180 m) and Flåtjerna (195 m), Kongsfjorden, Ny Ålesund, Spitsbergen, Svalbard, Norway	
Family Sphaerocystidaceae		Basionym		Altitude 20 m a.s.l.	
Order Chlamydomonadales		see >		Country of origin Svalbard (Norway)	
Class Chlorophyceae		Synonyms		Please observe possible regulations according to the Nagoya Protocol (accessions after 12-06-2014)	
Phylum Chlorophyta		Taxonomic Publication		Nagoya related docs available? <input checked="" type="radio"/> yes <input type="radio"/> no	
Taxonomic Publication		CollectorName_Leigit Torsten Mueller		IsolatorName Thomas Leya	
		CollectionSampleNo 003/98		IsolatorSampleNo	
		CollectionDateStart 15.07.1998		IsolationDateStart 10.12.1999	
		CollectionDateEnd		IsolationDateEnd	
		DepositorName Thomas Leya		IdentifierName Thomas Leya	
		DepositionDateStart 10.12.1999		IdentifierDateStart	
		DepositionDateEnd		IdentifierDateEnd	
		IdentificationMethod			

Annexe 3 : Photographies du PBR ainsi que l'observation cellulaire de la culture de *Pleurastrum sp.* aux premières 24 heures après le démarrage de la phase rouge (photo à gauche), et en fin de la phase rouge (photo à droite).



Annexe 4 : Milieu de culture BBM utilisé pour la culture des microalgues psychrophiles.

BBM Medium (Bold's Basal Medium + soil extract + vitamins)

Bischoff, H.W. & Bold, H.C. (1963): Phycological studies. IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. - *University of Texas Publications* 6318: 1-95. - modified according to
 Starr, R.C. & Zeikus, J.A. (1993): UTEX - The culture collection of algae at the University of Texas at Austin. - *J. Phycol.* 29(supplement S2): 1-106.
 Andersen, R.A. (ed.) (2005): *Algal culturing techniques*, 578pp, Elsevier Academic Press, London.

For 1000 mL final culture medium add the following quantities (Volume) of stock solutions (SL) prepared at the given concentrations to 850 mL distilled water. Add **one component after the other until each one has completely mixed** and finally fill up to 1000 mL.

All stock solutions can be stored unsterilised at 4 °C. Store sterile-filtered vitamin mix (SL 12) at -20 °C.

Stock Solution (SL)	Volume	Component	Concentration in SL	Conc. in final Medium
SL 1	10 mL	NaNO ₃	2.50 g · 100 mL ⁻¹	2.94 · 10 ⁻³ M
SL 2	10 mL	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.75 g · 100 mL ⁻¹	3.04 · 10 ⁻⁴ M
SL 3	10 mL	NaCl	0.25 g · 100 mL ⁻¹	4.28 · 10 ⁻⁴ M
SL 4	10 mL	K ₂ HPO ₄	0.75 g · 100 mL ⁻¹	4.31 · 10 ⁻⁴ M
SL 5	10 mL	KH ₂ PO ₄	1.75 g · 100 mL ⁻¹	1.29 · 10 ⁻³ M
SL 6	10 mL	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.25 g · 100 mL ⁻¹	1.70 · 10 ⁻⁴ M

For **3N-BBM** add triple quantity of NaNO₃, i.e. 30 mL of SL 1.

For **15psu-swBBM** use sterile filtered artificial seawater with 15 psu salinity.

SL 7		ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.82 g · L ⁻¹	3.07 · 10 ⁻⁵ M
Trace elements solution	1 mL	MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.44 g · L ⁻¹	7.28 · 10 ⁻⁶ M
		MoO ₃	0.71 g · L ⁻¹	4.93 · 10 ⁻⁶ M
		CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.57 g · L ⁻¹	6.29 · 10 ⁻⁶ M
		Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0.49 g · L ⁻¹	1.68 · 10 ⁻⁶ M

Combine all trace elements in one SL. Dissolve each component completely one after the other. It may need autoclaving to dissolve. Trace elements solution should **not** be stored in glass containers, but instead in teflon or polycarbonate containers to prevent adsorption of metals to container surface.

SL 8	1 mL	H ₃ BO ₃	1.14 g · 100 mL ⁻¹	1.85 · 10 ⁻⁴ M
SL 9	1 mL	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O (Titrplex III)	5.0 g · 100 mL ⁻¹	1.71 · 10 ⁻⁴ M
EDTA-KOH solution		KOH	3.1 g · 100 mL ⁻¹	5.53 · 10 ⁻⁴ M
SL 10	1 mL	FeSO ₄ · 7H ₂ O	4.98 g · L ⁻¹	1.79 · 10 ⁻⁵ M
Ferric solution		H ₂ SO ₄ conc.	1 mL (to acidify)	

This results in the original Bold's Basal Medium (BBM) according to Bischoff & Bold (1963). The pH-value will be about 6.4 to 6.8 at a conductivity of 1.4 mS cm⁻¹.

Soil extract (SL 11): For optimal maintenance of algal stock cultures this BBM is modified by the addition of **soil extract (SL 11)**. The soil extract often helps to culture species which are otherwise often hard to culture, but can be left out for mass culturing.

SL 11 (soil extract)	50 mL	garden or deciduous forest soil (no fertilisers or pesticides)		
----------------------	-------	--	--	--

Boil 50 g soil in 500 mL distilled water for 5 minutes, let sediment, decant supernatant and centrifuge (15 min. at 5500 rpm), then filter through 1.2-3 µm filter until clear. Tyndallize (important to kill fungal spores!): heat the extract to 100 °C for 15-30 min., then rapidly cool to room temperature and let stand for 24 h; repeat this two more times on consecutive days. Finish by one autolave cycle (121 °C for 30 min.). Store at +4 °C.

Adjust medium to final pH of 5.5 / 6.5 or as desired with HCl and autoclave at 121 °C for 20 min.

The addition a vitamin mix is advised as some algal species need one or two of the vitamins contained in the mix.

SL 12		Vit. B ₁ (Thiamine HCl)	0.1 g · 100 mL ⁻¹	2.97 · 10 ⁻⁶ M
Vitamin mix	1 mL	Vit. H (Biotin)	0.025 mg · 100 mL ⁻¹	1.02 · 10 ⁻⁹ M
		Vit. B ₁₂ (Cyanocobalamin)	0.015 mg · 100 mL ⁻¹	1.11 · 10 ⁻¹⁰ M

For storage acidify to a pH of 4.5-5.0 and autoclave, or dispense aseptically through 0.2 µm sterile filters in plastic containers (reaction vials, cryovials, polycarbonate tubes) in 1 mL aliquots and **add aseptically to prepared medium after autoclaving and cooling**. Store at -20 °C.

For stock cultures on agar slants add 1.0-1.3 % Agar (e.g. purified high strength, 1000 g · cm⁻²) to prepared medium before autoclaving.