THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées)
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

École Doctorale : Chimie Écologie Géosciences Agrosciences « *Théodore Monod* »

Secteur de Recherche : Biologie des organismes

Présentée par :

Marion Champeaud

****

Développement d'un procédé de production en bioréacteur de la microalgue *Galdieria sulphuraria* riche en protéines et antioxydants en utilisant des coproduits de l'industrie laitière comme substrat.

****

Directeurs de Thèse :
Maryse Laloi et Olivier Cagnac

****

Soutenue le 24 juin 2019

devant la Commission d'Examen

****

JURY

Président	Florent Allais	Professeur AgroParisTech
Rapporteur	Daniel Wipf	Professeur Université de Dijon
Rapporteur	Fayza Daboussi	Directrice de recherche INRA
Examinateur	Catherine Bennetau-Pelissero	Professeur Université de Bordeaux
Directrice	Maryse Laloi	Maître de conférences Université de Poitiers
Directeur	Olivier Cagnac	Chef de projet Fermentalg, PhD

THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées)
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

École Doctorale : Chimie Écologie Géosciences Agrosciences « *Théodore Monod* »

Secteur de Recherche : Biologie des organismes

Présentée par :

Marion Champeaud

****

Développement d'un procédé de production en bioréacteur de la microalgue *Galdieria sulphuraria* riche en protéines et antioxydants en utilisant des coproduits de l'industrie laitière comme substrat.

****

Directeurs de Thèse :
Maryse Laloi et Olivier Cagnac

****

Soutenue le 24 juin 2019

devant la Commission d'Examen

****

JURY

Président	Florent Allais	Professeur AgroParisTech
Rapporteur	Daniel Wipf	Professeur Université de Dijon
Rapporteur	Fayza Daboussi	Directrice de recherche INRA
Membre	Catherine Bennetau-Pelissero	Professeur Université de Bordeaux
Directrice	Maryse Laloi	Maître de conférences Université de Poitiers
Directeur	Olivier Cagnac	Chef de projet Fermentalg, PhD

CONFIDENTIALITE

« © Tous droits réservés. Ce document, dans son contenu et dans sa forme, est strictement confidentiel et il est la propriété de FERMENTALG. Toute utilisation, reproduction, modification, communication à un tiers ou représentation intégrale ou partielle du présent document qui n'a pas été préalablement expressément autorisée par FERMENTALG est formellement interdite. Une telle utilisation, reproduction, modification, communication ou représentation non autorisée, par quelque moyen que ce soit, constituerait une atteinte aux droits de FERMENTALG et une contrefaçon sanctionnée par la loi aux plans pénal et civil ».

"© All rights reserved. The content and form of this document is FERMENTALG's property and is strictly confidential. It is strictly prohibited to use, copy, modify, disclose or perform this document in full or in part without prior written authorization from FERMENTALG. Any such unauthorized use, copying, modification, disclosure or performance, in any way or manner whatsoever, shall qualify as a breach of FERMENTALG's rights and an infringement punishable by criminal and civil law."

Nom : Champeaud **Prénom** : Marion

Titre : Développement d'un procédé de production en bioréacteur de la microalgue *Galdieria sulphuraria* riche en protéines et antioxydants en utilisant des coproduits de l'industrie laitière comme substrat.

Année : 2019 **Lieu** : Fermentalg

Résumé :

L'accroissement de la population mondiale et le besoin en protéines d'origine végétale ressenti dans le secteur de la nutrition humaine et animale mettent en avant la nécessité de développer de nouvelles méthodes de production de protéines non animales ayant des vertus nutritives et des procédés de production économiques et écoresponsables. *Galdieria sulphuraria* est une microalgue pouvant être cultivée en bioréacteur de type industriel et sa composition intracellulaire riche en acides aminés essentiels et phycocyanine en fait une source protéique d'intérêt. Cette espèce a la capacité d'utiliser de nombreux substrats carbonés. La consommation de lactose et d'autres sources de carbone organique présentes dans les coproduits d'industrie laitière n'a pas encore été étudiée ni exploitée. La valorisation du lactosérum ou des perméats lactés est l'une des préoccupations environnementales majeures de l'industrie laitière de nos jours, en particulier le lactosérum acide difficile à traiter à cause de ses fortes teneurs en acides organiques.

L'objectif de ce travail est de développer un modèle de fermentation industrialisable permettant l'utilisation de ces sous-produits laitiers pour la production de biomasse micro-algale à valeur ajoutée. Ce travail démontre la capacité de *G. sulphuraria* à consommer 100% du lactose et la majorité des acides organiques présents dans le perméat de lait et à diminuer sa DCO (Demande chimique en oxygène) de 90% au cours du procédé de production. Le procédé de culture en mode chémostat a permis d'atteindre des performances de croissance de 1 g/L/h de biomasse sèche avec une production de 0,45-0,5 g/L/h de protéines et 25-35 mg/L/h de phycocyanine.

La caractérisation des systèmes de transport cellulaire de sucres chez *G. sulphuraria* suggère que le lactose serait absorbé par un système de co-transport sucre/H^+ à faible affinité et capable de transporter plus efficacement le glucose et le galactose.

Une analyse de l'expression différentielle des gènes en fonction des conditions de culture a révélé que des gènes codant des transporteurs de sucres et des enzymes du métabolisme carboné sont surexprimés en présence de perméat de lait. De même, l'expression de gènes responsables de la production de phycocyanine est induite en mixotrophie et dans un variant producteur de phycocyanine en hétérotrophie.

Enfin, l'analyse des propriétés nutritionnelles de la biomasse de *G. sulphuraria* montre une teneur importante en acides aminés essentiels et une digestibilité des protéines de 92,2% donnant un PDCAAS (Score des Acides Aminés Corrigé en fonction de la Digestibilité des Protéines) de 0,9. Ce produit est également riche en vitamines, fer et manganèse et a des propriétés antioxydantes prouvées *in vitro*.

Mots-clés : *Galdieria sulphuraria*, coproduits laitiers, lactose, bioprocédé, mixotrophie, hétérotrophie, protéines, phycocyanine.

Last-name: Champeaud **First-name**: Marion

Title : Development of a bioreactor production process for the protein- and antioxidant-rich microalgae *Galdieria sulphuraria* using by-products from the dairy industry as a substrate.

Year : 2019 **Place** : Fermentalg

Abstract :

The increase of the world population and the need for proteins of plant origin demanded by the sectors of human and animal nutrition highlights the need to develop new methods of producing nutritious animal-free proteins through cost-effective and sustainable production processes. *Galdieria sulphuraria* is a microalga that can be grown in industrial bioreactors and its composition rich in essential amino acids and phycocyanin makes it a protein source of interest. This species has the capacity to use many carbon substrates. The consumption of lactose and other sources of organic carbon present in dairy by-products has not yet been studied nor exploited. The valorization of whey or milk permeate is one of the major environmental concerns of the dairy industry today, especially acid whey, which is difficult to treat due to its high levels of organic acids.

The objective of this work is to develop a fermentation process that could be scaled industrially allowing the use of these dairy by-products for the production of value-added microalgal biomass. *G. sulphuraria* is able to consume 100% of lactose and the majority of organic acids present in the milk permeate, decreasing its COD (Chemical Oxygen Demand) by 90% during the process. Culture in chemostat mode has achieved growth performance of 1 g/L/h of dry biomass with a production of 0.45-0.5 g/L/h of protein and 25-35 mg/L/h of phycocyanin.

Characterization of sugar cell transport systems in *G. sulphuraria* suggests that lactose is absorbed by a low affinity sugar/H^+ co-transport system able to also transport glucose and galactose with greater affinity.

Differential gene expression study in different growth conditions revealed that some genes encoding sugar transporter and enzymes of carbon metabolism are overexpressed in milk permeate growth medium. Genes responsible for phycocyanin production were overexpressed under mixotrophic conditions and in a variant that produces phycocyanin in heterotrophy.

Finally, an analysis of the nutritional properties of the *G. sulphuraria* biomass confirmed a high content of essential amino acids and a protein digestibility of 92.2%, giving a PDCAAS (Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score) of 0.9. This product is also rich in vitamins, iron and manganese and has proven antioxidant properties *in vitro*.

Key words: *Galdieria sulphuraria*, dairy by-products, lactose, bioprocess, mixotrophy, heterotrophy, proteins, phycocyanine.

REMERCIEMENTS

Cette thèse CIFRE a été réalisée en collaboration avec l'entreprise Fermentalg et le laboratoire Écologie et Biologie Interactive de l'Université de Poitiers entre Juillet 2016 et Juillet 2019, dans le cadre d'un dispositif CIFRE (Conventions Industrielles de Formation par la Recherche) financé par le ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation.

Je remercie Mme Daboussi Fayza et M Wipf Daniel d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse ainsi que Mme Benneteau-Pelissero, M Allais Florent d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Merci au Président Directeur Général de Fermentalg, Philippe Lavielle et à son directeur scientifique Hywel Griffiths pour avoir soutenu l'initiative de ce projet de thèse et pour m'avoir permis de réaliser une mobilité en Nouvelle-Zélande dans le cadre de ce doctorat.

Je tiens à remercier très chaleureusement mes directeurs de thèse, Maryse Laloi et Olivier Cagnac pour leur soutien et leur implication dans ce projet.
Merci Maryse de m'avoir accueilli dans l'équipe SEVE du laboratoire EBI de l'Université de Poitiers, merci pour les échanges scientifiques que nous avons eus. Ta passion pour le métier de chercheur et professeur se ressent profondément et c'était un réel plaisir de travailler avec toi.
Je remercie tout particulièrement Olivier Cagnac, Chef de projet Fermentalg et grand scientifique. Merci Olivier pour m'avoir épaulé depuis ces 6 dernières années, merci d'avoir conçu ce projet de thèse, de m'avoir fait confiance pour le réaliser, de l'avoir suivi et valorisé. Je te remercie sincèrement de m'avoir transmis la passion de la « biologie », merci de m'avoir poussé dans mes retranchements, merci pour tes conseils toujours bienveillants, pour ton implication constante, pour ton énergie et pour ton amitié.

Je tiens également à remercier mes collègues de Fermentalg, une réelle dynamique existe dans cette entreprise et ce fut un plaisir de travailler au quotidien dans cet environnement. Merci à toutes les personnes ayant travaillé de près ou de loin sur ce projet et merci plus particulièrement à l'équipe « Bastille » pour leur soutien, leurs conseils et leur aide. J'ai beaucoup appris au cours de ces années et cela grâce aux échanges et à la transmission du savoir au sein de cette entreprise.

Enfin je remercie ma famille et mes amis pour leur soutien inconditionnel dans toutes les actions que j'entreprends, merci d'être toujours là, vous êtes mon équilibre.

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION ET CONTEXTE DE L'ETUDE 1

A. INTRODUCTION GENERALE 2
B. CONTEXTE DE L'ETUDE 3
1. Les protéines végétales une alternative aux protéines animales 3
2. Les microalgues et extraits d'algues présents sur le marché 4

II. ETAT DE L'ART 7

A. L'INDUSTRIE DE LA SPIRULINE ET SES LIMITES 8
1. Taxonomie et habitats 8
2. Composition cellulaire 8
3. Production à l'échelle industrielle 8
4. La Spiruline une réponse aux besoins du marché 11
B. LA PHYCOCYANINE (C-PC) 14
1. Rôle dans la cellule et structure 14
2. Synthèse de phycocyanine et régulation 15
3. Propriétés physico-chimiques 17
4. Techniques d'extraction de la phycocyanine 18
5. Effet santé 19
C. UNE ALTERNATIVE A LA SPIRULINE, LES *CYANIDIOPHYCEAE* 20
1. Les Cyanidiophyceae, habitat et phylogénie 20
2. Génome des Cyanidiophyceae 22
3. G. sulphuraria, les intérêts de cette souche microalgale 22
4. La culture de G. sulphuraria 24
D. LES COPRODUITS DES PROCEDES LAITIERS : DES SUBSTRATS ALTERNATIFS 26
1. Les problématiques de l'industrie laitière 27
2. Impact des effluents laitiers sur l'écosystème, exemple de la Nouvelle Zélande 28
3. Les valorisations existantes 28
E. OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE 34

III. MATERIEL ET METHODES 35

A. MICROALGUES : SOUCHE D'INTERET ET VARIANTS 36
1. Souche d'intérêt 36
2. Variants 36
B. MILIEUX DE CULTURE 36
1. Milieu de culture solide 36
2. Milieu de culture liquide avec des substrats purs 36
3. Milieu de culture avec des substrats complexes : coproduits des industries laitières 37
C. MISE EN CULTURE DES MICROALGUES 37
1. Culture en Erlenmeyer 37
2. Culture en bioréacteur de laboratoire 38
3. Culture en bioréacteur de type industriel 38
4. Conduite de culture 39
D. TECHNIQUES ANALYTIQUES 41
1. Caractérisation de la biomasse 41
2. Composition cellulaire 42
3. Suivi de consommation 44
4. Analyse du produit fini 44
E. CARACTERISATION DES SYSTEMES DE TRANSPORT DE SUCRES DE *G. SULPHURARIA* 46
1. Absorption de sucres radio-marqués par une suspension cellulaire de G. sulphuraria 46
2. Détermination des paramètres cinétiques et de la spécificité des systèmes de transport de sucres . 46
F. ÉTUDE DIFFERENTIELLE DE L'EXPRESSION DES GENES 47
1. Assemblage de novo du génome de G. sulphuraria 47

2. Étude comparative 47
3. Extraction des ARNs 48
CONTROLE QUALITE : 48
CONTROLE QUANTITE : 48
4. Séquençage 48
5. Analyse bio-informatique 49

IV. RESULTATS 50

A. RECHERCHE ET DEVELOPPEMENT DU PROCEDE DE PRODUCTION 52
1. Sélection, criblage et caractérisation de la souche 52
2. Effet de la lumière sur la croissance et la composition cellulaire 55
3. Optimisation du milieu de culture 57
4. Évolution de la souche d'intérêt et élargissement des substrats de culture 62
5. Développement d'un procédé Fed-batch en bioréacteur de laboratoire 68
6. Procédé à haute densité cellulaire et effet d'une maturation 76
7. Développement d'un procédé de production en Chémostat sur milieu PDL 78
8. Amélioration continue d'un procédé de production 80
9. Procédé de production Fed-Batch à échelle pilote 81
10. Conclusions intermédiaires spécifiques au procédé de production 82
B. CARACTERISATION DU TRANSPORT CELLULAIRE DE *G. SULPHURARIA* 83
1. Étude de l'absorption du lactose 83
2. Étude de l'absorption du glycérol 86
3. Étude de l'absorption du glucose et du galactose 87
4. Caractérisation des mécanismes de transport 90
5. Conclusions sur le transport du glycérol et du lactose par G. sulphuraria 92
C. ÉTUDE DE L'EXPRESSION DES GENES (RNASEQ) 92
1. Travaux préliminaires à l'étude différentielle 93
2. Études d'expressions différentielles 96
3. Gènes fortement exprimés et corrélation 101
4. Conclusions sur l'analyse différentielle de l'expression des gènes chez G. sulphuraria 104
D. POTENTIEL NUTRITIONNEL DU PRODUIT ET CAPACITE DEPOLLUANTE DU PROCEDE 105
1. Qualité nutritionnelle de la biomasse de G. sulphuraria 105
2. Valeurs énergétiques et nutritionnelles 105
3. Sécurité alimentaire 108
4. Effet bio-remédiation du procédé du production 109
5. Conclusions sur le potentiel nutritionnel de G. sulphuraria 110

V. DISCUSSION 111

A. UNE SOUCHE VERSATILE ET PRODUCTRICE DE PHYCOCYANINE 112
1. Effet du Permeat de lait sur la pigmentation : 112
2. Effet du permeat de lait sur la croissance en hétérotrophie et en mixotrophie : 113
3. Sélection de variants adaptés au PDL : 113
4. Étude de l'expression différentielle des gènes entre la souche sauvage et le variant : 114
5. Adaptation et induction du métabolisme en fonction du substrat carboné : 115
B. IDENTIFICATION ET CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DU SYSTEME DE TRANSPORT DE LACTOSE CHEZ *GALDIERIA SULPHURARIA* 116
1. Identification génétique du système de transport du lactose 116
2. Identification biochimique des systèmes de transport 117
C. NOTRE PROCEDE DE PRODUCTION ET LES PROCEDES EXISTANTS 121
1. Procédés de production utilisant les coproduits laitiers : 121
2. Procédés de production de phycocyanine par G. sulphuraria : 123
3. Stratégie de pilotage par une limitation de la source carbonée et impact sur la C-PC 124
4. Comparaison avec la production de phycocyanine par la Spiruline 125
D. FAISABILITE TECHNICOECONOMIQUE 125
E. PRODUIT INNOVANT A FORT POTENTIEL NUTRITIONNEL 126
1. Protéines : 126
2. Apport en micronutriments : 128

3. Les antioxydants 129
4. L'aspect réglementaire 130
5. Culture verticale et emprunte environnementale 130

VI. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 132

VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 136

VIII. ANNEXES 156

TABLE DES FIGURES

FIGURE 1. TENDANCE MONDIALE DE CONSOMMATION DE VIANDE ET PROJECTIONS POUR 2050 2
FIGURE 2. ÉVOLUTION DU MARCHE DES PROTEINES ALTERNATIVES A L'HORIZON 2050 4
FIGURE 3. ESTIMATION DE LA CONSOMMATION JOURNALIERE EN SPIRULINE 12
FIGURE 4. SCHEMA D'UNE CYANOBACTERIE 14
FIGURE 5. SCHEMA DE LA MEMBRANE DES THYLAKOÏDES DE CYANOBACTERIES 14
FIGURE 6. STRUCTURE CRISTAL DE LA PHYCOCYANINE DE GALDIERIA SULPHURARIA 15
FIGURE 7. VOIE DE BIOSYNTHESE DE LA PHYCOCYANINE 17
FIGURE 8. RESISTANCE AU PH ACIDE ET A LA TEMPERATURE DE LA PHYCOCYANINE EXTRAITE DE GALDIERIA SULPHURARIA 18
FIGURE 9. ARBRE PHYLOGENETIQUE CREE A PARTIR DES SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES DU GENE DE LA RUBSICO (RBCL) DES CYANIDIOPHYCEAE 21
FIGURE 10. CYANIDIALES (CYANIDIUM CALDARIUM) EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION 21
FIGURE 11. MODELE DE REGULATION DES TRANSPORTEURS DE SUCRES/POLYOL CHEZ G. SULPHURARIA 25
FIGURE 12. SCHEMA SIMPLIFIE DES PRODUITS ET COPRODUITS DE L'INDUSTRIE LAITIERE. 27
FIGURE 13. COMPARAISON DES COMPOSANTES DU LAIT DE VACHE ET DU LACTOSERUM 28
FIGURE 14. VOIES DE VALORISATION DES COPRODUITS LAITIERS 29
FIGURE 15. SCHEMA DE TRAITEMENT PAR METHANISATION 30
FIGURE 16. SCHEMA DU CHAINAGE DE PRE-CULTURES 38
FIGURE 17. SCHEMA DU PLAN D'EXPERIENCE DE L'ETUDE DIFFERENTIELLE D'EXPRESSION DES GENES 48
FIGURE 18. SUIVI DE CROISSANCE DE TROIS SOUCHES DE CYANIDIOPHYCEA 53
FIGURE 19. CRIBLAGE SUBSTRATS DE LA SOUCHE UTEX2919. 53
FIGURE 20. COMPARAISON DE LA CROISSANCE ET DE LA COMPOSITION CELLULAIRE DE LA SOUCHE UTEX 2919 CULTIVEE EN MIXOTROPHIE SUR UN MILIEU CONTENANT DU GLYCEROL OU DU PDL 54
FIGURE 21. COMPARATIF DE CULTURE DE LA SOUCHE UTEX2919 SUR UN MILIEU CONTENANT DU LACTOSE OU DU PDL 55
FIGURE 22. CARACTERISATION DE LA SOUCHE UTEX2919. 56
FIGURE 23. SUIVI DE CROISSANCE DE LA SOUCHE UTEX2919 APRES UNE ADAPTATION AU PDL PAR REPIQUAGE 57
FIGURE 24. SUIVI DE LA CROISSANCE DE LA SOUCHE UTEX2919 EN FONCTION DE LA CONCENTRATION INITIALE EN PERMEAT DE LAIT DANS LE MILIEU DE CULTURE. 58
FIGURE 25. SUIVI DE LA CROISSANCE DE LA SOUCHE UTEX2919 EN FONCTION DU PH SUR LE MILIEU TYPE PDL EN MIXOTROPHIE 58
FIGURE 26. SUIVI DE CROISSANCE DE LA SOUCHE UTEX2919 ADAPTEE AU MILIEU PDL EN LUMIERE BLANCHE OU LUMIERE BLEUE AVEC DES INTENSITES LUMINEUSES DIFFERENTES 59
FIGURE 27. SUIVI DE CROISSANCE ET DE LA PRODUCTION EN C-PC DE LA SOUCHE UTEX2919 EN PRESENCE DE LUMIERE BLANCHE ET LUMIERE BLEUE 60
FIGURE 28. COMPARAISON DE CROISSANCE DE LA SOUCHE UTEX2919 SUR LE MILIEU PDL INITIAL ET LE MILIEU PDL OPTIMISE 62
FIGURE 29. CARACTERISATION DE LA SOUCHE VARIANTE FCC3222 CULTIVEE EN MIXOTROPHIE ET HETEROTROPHIE SUR PERMEAT DE LAIT. 63
FIGURE 30. CROISSANCE ET COMPOSITION CELLULAIRE DE LA SOUCHE FCC3222 SUR DIFFERENTS COPRODUITS LACTES 64
FIGURE 31. COMPOSITION DU LACTOSERUM ET PERMEAT 65
FIGURE 32. SUIVI DE LA CONSOMMATION EN LACTOSE ET EN ACIDES ORGANIQUES DES DIFFERENTS COPRODUITS LACTES 65
FIGURE 33. CARACTERISATION DU DEVELOPPEMENT DE LA SOUCHE FCC 3222 SUR UN MELANGE DE SUBSTRAT (PERMEAT DE LAIT + GLYCEROL) EN MIXOTROPHIE ET HETEROTROPHIE 67
FIGURE 34. CULTURE FED-BATCH DE LA SOUCHE DE G. SULPHURARIA FCC 3222 SUR PERMEAT DE LAIT 69
FIGURE 35. SUIVI DE LA TENEUR INTRACELLULAIRE ET DE LA CONCENTRATION EN C-PC B) 69
FIGURE 36. COURBE DE CORRELATION DE LA C-PC EN FONCTION DE LA MS. 70
FIGURE 37. SUIVI DE LA CONCENTRATION EN ACIDES ORGANIQUES LORS DU PROCEDE EN MIXOTROPHIE. 70
FIGURE 38. CULTURE FED-BATCH DE LA SOUCHE DE G. SULPHURARIA FCC3222 SUR LACTOSE PUR 72
FIGURE 39. CULTURE FED-BATCH DE LA SOUCHE G. SULPHURARIA FCC3222 SUR UN MELANGE DE SUBSTRAT PDL-GLYCEROL) EN MIXOTROPHIE 73
FIGURE 40. CULTURE FED-BATCH DE LA SOUCHE G. SULPHURARIA FCC3222 EN MIXOTROPHIE SUR UN MILIEU PDL PUIS AJOUT DE 20G/L DE GLYCEROL EN FIN DE CULTURE 75
FIGURE 41. CULTURE FED-BATCH DE LA SOUCHE FCC 3222 A FORTE DENSITE CELLULAIRE. 77

FIGURE 42. CORRELATION DE LA TENEUR INTRACELLULAIRE EN C-PC EN FONCTION DU POURCENTAGE DE SUCRES TOTAUX DANS LA BIOMASSE 78
FIGURE 43. CULTURE DE LA SOUCHE FCC 3222 EN CHEMOSTAT SUR UN MILIEU PERMEAT DE LAIT 79
FIGURE 44. ÉVOLUTION DE LA TENEUR INTRACELLULAIRE ET DE LA CONCENTRATION EN C-PC AU COURS DE LA CULTURE EN CHEMOSTAT SUR UN MILIEU PERMEAT DE LAIT 79
FIGURE 45. CULTURE EN CHEMOSTAT DE LA SOUCHE FCC3432 EN HETEROTROPHIE SUR DU MILIEU PDL..... 80
FIGURE 46. CULTURE DE LA SOUCHE FCC3432 EN HETEROTROPHIE EN BIOREACTEUR DE 100L SUR UN MILIEU PDL……. 81
FIGURE 47. CINETIQUE DE L'ABSORPTION DU LACTOSE PAR LES CELLULES DE G. SULPHURARIA..... 84
FIGURE 48. CINETIQUE D'ABSORPTION DU LACTOSE SUR LES CELLULES PRE-CULTIVEES SUR GLYCEROL EN MIXOTROPHIE (MGLY) EN FONCTION DE SA CONCENTRATION DANS LE MILIEU. 85
FIGURE 49. CINETIQUE DE L'ABSORPTION DU GLYCEROL PAR LES CELLULES DE G. SULPHURARIA. 86
FIGURE 50. CINETIQUE DE L'ABSORPTION DU GLUCOSE DANS LES CELLULES DE G. SULPHURARIA. 88
FIGURE 51. CINETIQUE D'ABSORPTION DU GALACTOSE AU COURS DU TEMPS. LES CELLULES SONT INCUBEES 0,
FIGURE 52. EFFET DU CCCP (10 μM) SUR LE TRANSPORT DE GLYCEROL (1MM), DE LACTOSE (50MM) ET DE GLUCOSE (1MM) 90
FIGURE 53. EFFET DE DIFFERENTS SUCRES SUR L'ABSORPTION DU LACTOSE. 91
FIGURE 54. SUIVI DE LA CROISSANCE ET DE LA COMPOSITION CELLULAIRE DES CULTURES EN MODE CHEMOSTAT. 93
FIGURE 55. EXPRESSION DIFFERENTIELLE DES GENES ENTRE LA SOUCHE UTEX 2919 CULTIVEE EN MIXOTROPHIE ET HETEROTROPHIE SUR UN MILIEU PDL. 96
FIGURE 56. DIFFERENTIEL D'EXPRESSION DES GENES ENTRE LA SOUCHE UTEX 2919 CULTIVEE SUR UN MILIEU PERMEAT DE LAIT ET UN MILIEU GLYCEROL EN HETEROTROPHIE. 98
FIGURE 57. DIFFERENTIEL D'EXPRESSION DES GENES ENTRE LA SOUCHE UTEX 2919 ET LA SOUCHE FCC3432 CULTIVEES SUR UN MILIEU PDL EN HETEROTROPHIE. 100
FIGURE 58. DIAGRAMME REPRESENTANT LES GENES (HORMIS LES TRANSPORTEURS) LES PLUS SUREXPRIMES D'UNE CONDITION A L'AUTRE. ..... 102_Toc8862738
FIGURE 59. COMPARAISON DES GENES CODANT POUR DES TRANSPORTEURS DE SUCRES ET AQUAGLYCEROPORINES LES PLUS SUREXPRIMES (X10) ENTRE LA CONDITION SUR GLYCEROL ET LES CONDITIONS SUR PDL. 103
FIGURE 61. COMPOSITION PROTEIQUE DE G. SULPHURARIA. 106
FIGURE 62. ADAPTATION DE LA VOIE DE BIOSYNTHESE DE LA C-PC A PARTIR DE NOS RESULTATS 115
FIGURE 63. SCHEMA DU SYSTEME DE TRANSPORT DE SUCRE HYPOTHETIQUE DE LA SOUCHE G. SULPHURARIA ……...120
FIGURE 64. SCHEMA HYPOTHETIQUE DE LA REGULATION DU SYSTEME D'ABSORPTION DE LACTOSE CHEZ G. SULPHURARIA 121
FIGURE 65. SCHEMA DU PROCEDE DE CULTURE EN CHEMOSTA DE LA SOUCHE FCC 3432 SUR UN MILIEU CONTENANT DU PERMEAT DE LAIT CONCENTRE A 300G/L. 125
FIGURE 66. SURFACE TERRESTRE UTILISE POUR PRODUIRE 100 MG (100 ML POUR LE LAIT) 130

TABLE DES TABLEAUX

TABLEAU 1. TENEURS MAXIMALES EN METAUX LOURDS ET EN IODE AUTORISEES EN FRANCE 13
TABLEAU 2. CRITERES MICROBIOLOGIQUES POUR LES PRODUITS SECS 13
TABLEAU 3. COMPARAISONS DES SEQUENCES DES APOPROTEINES α ET β DE C-PC DE DIFFERENTS ORGANISMES 16
TABLEAU 4. MILIEU DE CULTURE AVEC DES SUBSTRATS PURS 36
TABLEAU 5. MILIEU DE CULTURE AVEC DES SUBSTRATS COMPLEXES 37
TABLEAU 6. STANDARDS MICROBIOLOGIQUES APPLICABLES AUX PRODUITS ALIMENTAIRES 45
TABLEAU 7. STANDARDS EN TENEUR MAXIMALES EN METAUX LOURDS DANS LES DENREES ALIMENTAIRES 45
TABLEAU 8. EXEMPLE DE LA COMPOSITION DU MELANGE REACTIONNEL POUR LES ESSAIS DE CINETIQUE 46
TABLEAU 9. TENEUR INTRACELLULAIRE EN PROTEINES EN FONCTION DU MODE TROPHIQUE DE CULTURE 57
TABLEAU 10. ANALYSE ICP DU PERMEAT DE LAIT DILUE A 30 G/L DANS DE L'EAU ADOUCIE 61
TABLEAU 11. EFFET DU CALCIUM SUR LA PRODUCTION DE C-PC 61
TABLEAU 12. COMPOSITION CELLULAIRE DE LA SOUCHE FCC3222 EN FIN DE CULTURE. 63
TABLEAU 13. TENEUR EN ACIDES ORGANIQUES ET LACTOSE DE COPRODUITS LAITIERS (30 G/L DE POUDRE).. 64
TABLEAU 14. POURCENTAGE DES ELEMENTS CONSOMMES EN FIN DE CULTURE 66
TABLEAU 15. INDICATEURS DE PERFORMANCES DE LA CULTURE FCC 3222 EN FED-BATCH 71
TABLEAU 16. COMPOSITION CELLULAIRE DE LA SOUCHE FCC 3222 EN FIN DE FED-BATCH 71
TABLEAU 17. COMPARATIF DES PERFORMANCES ENTRE LE PROCEDE DE PRODUCTION SUR PDL ET LACTOSE 72
TABLEAU 18. BILAN DES PERFORMANCES FINALES DES PROCEDES DE PRODUCTION EN MIXOTROPHIE 74
TABLEAU 19. INDICATEURS DE PERFORMANCES DES DIFFERENTS PROCEDES AVEC PDL 76
TABLEAU 20. INDICATEURS DE PERFORMANCE AVANT ET APRES MATURATION 78
TABLEAU 21. TEST DE STUDENT ENTRE LES CINETIQUES D'ABSORPTION DU GLYCEROL 87
TABLEAU 22. TEST DE STUDENT ENTRE LES CINETIQUES D'ABSORPTION DU GLUCOSE 89
TABLEAU 23. LISTE DES GENES LES PLUS DIFFEREMMENT SUREXPRIMES (X3) ENTRE LES CONDITIONS MIXOTROPHIE ET HETEROTROPHIE 97
TABLEAU 24. LISTE DES GENES LES PLUS DIFFEREMMENT SUREXPRIMES (X5) ENTRE LES CONDITIONS PERMEAT DE LAIT ET LA CONDITION GLYCEROL. 98
TABLEAU 25. LISTE DES GENES LES PLUS DIFFEREMMENT EXPRIMES (X20) ENTRE LA SOUCHE SAUVAGE UTEX2919 ET LA SOUCHE VARIANTE FCC3432 100
TABLEAU 26. COMPOSITION CELLULAIRE DU PRODUIT G. SULPHURARIA 105
TABLEAU 27. DOSAGE DES DIFFERENTS TYPES D'ACIDES GRAS (METHODE INTERNE GC/FID DE EUROFINS) 106
TABLEAU 28. TENEUR EN VITAMINES DE GALDIERIA SULPHURARIA 107
TABLEAU 29. COMPOSITION EN PIGMENTS DE GALDIERIA 107
TABLEAU 30. METAUX LOURDS DOSES 108
TABLEAU 31. CONTAMINANTS MICROBIOLOGIQUES DOSES 109
TABLEAU 32. SUIVI DE LA DCO DES MILIEUX ET SURNAGEANTS DE CULTURE 109
TABLEAU 33. BILAN DES PROCEDES DE PRODUCTION DE PROTEINES UNICELLULAIRES UTILISANT LES COPRODUITS LACTES 122
TABLEAU 34. BILAN DES PERFORMANCES GLOBALES DES PROCEDES DE PRODUCTION REALISE DANS CE TRAVAIL 123
TABLEAU 35. CULTURES DE GALDIERIA SULPHURARIA POUR LA PRODUCTION DE C-PC 123
TABLEAU 36. COMPARATIF DES SOURCES DE PROTEINES 126
TABLEAU 37. PROFIL EN ACIDES AMINES ESSENTIELS DES SOURCES PRINCIPALES SOURCES DE PROTEINES VEGETALES PRESENTENT SUR LE MARCHE. 127
TABLEAU 38. MESURE DU POTENTIEL ANTIOXYDANT DES ALIMENTS 129
TABLEAU 39. EMPRUNTE HYDRIQUE DE PLUSIEURS SOURCE DE PROTEINES 131

NOMENCLATURE

Symbole	Description	Unité
m	Coefficient de maintenance cellulaire	$g_S/g_{MS}/h$
MS	Concentration en biomasse	g/L
μ	Taux de croissance	h^{-1}
Q	Débit	L/h
q_S	Vitesse spécifique de consommation du substrat	$mole/g_{MS}/h$
r_S	Vitesse volumique relative au substrat	mole/L/h
r_{MSS}	Rendement de biomasse MS formée par rapport au substrat S consommé	g_{MS}/g_S
S	Concentration en substrat S	g_S/L
t	Temps	h
V	Volume de la phase liquide du bioréacteur	L
Y_{MSS}	Rendement théorique limite en biomasse formée MS par rapport au substrat S	g_{MS}/g_S

ABREVIATIONS

ALA	Acide α-aminolévulinique
APC	Allophycocyanine
C-PC	Phycocyanine
CO_2	Dioxyde de carbone
DCO	Demande chimique en oxygène
GC-FID	Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme
K_{La}	Coefficient de transfert de l'oxygène
MS	Concentration en biomasse
O_2	Dioxygène
PBS	Phycocbilisome
PCB	Phycocyanobiline
PDL	Perméat de lait
pO2	Pression partielle en oxygène
PSI	Photosystème I
PSII	Photosystème II

I. INTRODUCTION ET CONTEXTE DE L’ETUDE

I. Introduction et contexte de l'étude

A. Introduction générale

Les enjeux de demain pour une planète où la population atteindra 10 milliards d'habitants sont nombreux. Les ressources en eau, le réchauffement climatique et l'alimentation sont les premiers aspects mis en avant. La nourriture doit être produite de manière durable afin de contribuer aux défis environnementaux tout en répondant aux besoins humains. La nourriture influence très largement la santé humaine, il est essentiel d'avoir une alimentation saine pour le bien-être de chacun et pour limiter les coûts de traitement des maladies (FAO, IFAD, UNICEF, WFP & WHO, 2018).

Le système alimentaire doit évoluer pour répondre à ces challenges en modifiant nos habitudes et en utilisant de nouvelles techniques de production. Nous vivons dans un environnement ou la consommation de produits animaux reste associée au plaisir, à la convivialité et reste un signe de richesse. La part de consommation animale a une croissance linéaire depuis les années 60 et a fortement augmenté notamment en Asie (Fig. 1).

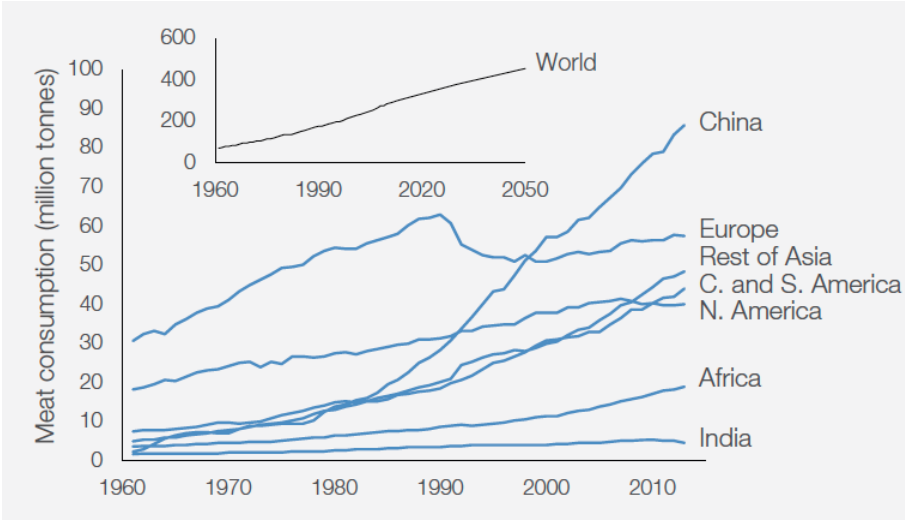


Figure 1. Tendance mondiale de consommation de viande et projections pour 2050 (Alexandratos and Bruinsma, 2012; The world Economic Forum, 2019)

En regardant l'impact des productions animales intensives sur l'environnement et le réchauffement climatique, on réalise facilement que les enjeux environnementaux sont liés aux modifications de nos habitudes alimentaires. Le mode de consommation occidentale évolue vers une modération de la consommation de viande, les classes moyennes et les populations en développement suivront cette évolution et infléchiront la tendance en cours.

Les protéines ont été après le sel, les épices et autres éléments aromatisants parmi les premiers « ingrédients » culinaires et technologiques utilisés. L'œuf et le lait ont toujours eu une place de choix en Europe, alors qu'en Asie les solutions végétales (TOFU ; Protéines végétales hydrolysées ; texturants végétaux) se sont développées depuis longtemps.

Aujourd'hui, le marché des protéines végétales est en croissance constante en Europe et aux États-Unis dans les secteurs de la nutrition humaine et animale. Cette tendance devrait s'accentuer sur le long terme au détriment des ingrédients à base de protéines animales.
Pour demain, les industriels de la nutrition-santé recherchent des sources de protéines végétales nouvelles, à haute valeur ajoutée, permettant d'offrir des alternatives durables, nutritives et fonctionnelles aux protéines d'origine animale. La source qui apportera « naturellement » un

bénéfice nutritionnel complémentaire aura une vraie valeur supplémentaire. Les microalgues peuvent donc trouver une place de choix.

B. Contexte de l'étude

1. Les protéines végétales une alternative aux protéines animales

Selon l'ONU (Organisation des Nations Unies), la population mondiale devrait atteindre 9,8 milliards en 2050 et 11,2 milliards en 2100. Afin de nourrir cette population croissante de 83 millions de personnes par an, la production alimentaire doit augmenter de 70% en respectant la santé humaine et l'environnement (Godfray et al., 2010) tout en sachant que le besoin en protéines est de 0,66 g/kg/j pour un adulte en bonne santé (EFSA, 2012). La majorité des protéines présentes dans l'alimentation européenne d'aujourd'hui est d'origine animale et les nouvelles recommandations de l'ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du Travail) incitent à réduire la consommation de viande rouge, notamment en France dans le cadre du futur PNN3 (Programme National Nutrition Santé) (ANSES, 2017a). Afin de répondre aux besoins des consommateurs de demain, il est nécessaire de trouver des sources alternatives de protéines et de nouvelles méthodes de production performantes et économiquement compétitives (Bleakley and Hayes, 2017). Le marché mondial des protéines végétales s'élevait à 5,9 milliards € en 2017 et le taux de croissance annuel est estimé à 7,1% entre 2017 et 2023. Cet accroissement du besoin en protéines végétales est lié à plusieurs facteurs comme : l'augmentation de la demande en produit de meilleure qualité nutritionnelle, la montée en puissance du végétarisme et du flexitarisme et le coût des matières protéiques végétales souvent inférieur à celui des protéines animales (Guéguen et al., 2016). La population végétarienne représente 30 millions de personnes aux États-Unis et 22 millions en Europe (mordorintelligence, 2018).

Les protéines végétales présentes sur le marché ont différentes teneurs en protéines, le soja (37,8%), les pois chiche (20,5%), les lentilles (25,4%), les haricots secs (24,5%) et la production de graines augmente. La production de chia (19,5%) a eu une croissance de 69% entre 2011 et 2015 ainsi que les graines de lin (20,2%), d'amandes (21,1%) et de noix de cajou (18%). Le soja domine le marché actuel des protéines végétales, sa production en Europe est de 6 millions de tonnes, celle-ci a plus que triplé en 5 ans et pourtant 17 millions de tonnes de protéines de plantes continuent d'être importées chaque année avec plus de 13 millions de tonnes de protéines de soja provenant du Brésil, d'Argentine ou des États-Unis (Friends of the Earth Europe, 2018). Pourtant les problématiques environnementales liées à la culture intensive du soja sont connues comme les déforestations, les conflits ruraux et la pollution environnementale du sud de l'Amérique. De plus, le soja est une source d'isoflavones, composés ostrogéniques pouvant exercer des perturbations du système endocrinien et l'effet de ces molécules sur la santé humaine restent encore non déterminé précisément (Bennetau-Pelissero, 2019). Les consommateurs sont de plus en plus sensibles à l'impact environnemental des modes de productions et des bénéfices santé des produits, c'est dans ce cadre-là qu'apparaît de nouveaux labels « origine naturelle », « clean label », « écoresponsable ». Un plan protéine a été créé par l'Europe pour réduire drastiquement la consommation industrielle de viande, de produits laitiers et pour diversifier la production de protéines végétales destinées à la nutrition humaine (foeeurope.org). La France se sent concernée par cette problématique de demain et c'est dans le but de trouver une stratégie nationale liée à la production de protéines végétales que Didier

Guillaume le ministre de l'Agriculture et de l'Alimentation a lancé une concertation nationale le 11 février 2019 (Ministère de l'agriculture et de l'alimentation, 2019).

Les grands leaders de l'agroalimentaire comme Cargill, Archer Daniels Midland (ADM), Kerry, Dupont Danisco et Glanbia dominent le marché et tentent de répondre aux besoins émergeants avec de nouvelles sources de protéines végétales. La société Roquette a construit au Canada la plus grosse usine de protéines de pois au monde et met sur le marché des protéines de pois sous la marque NUTRALYS®. Tereos annonce le succès de ses premières fricassés végétales à base de protéines, de fibres de blé et de légumineuses produites par son unité pilote implantée sur le site industriel Tereos de Marckolsheim en Alsace (Les echos, 2017). La production de végétaux nécessite des espaces de culture, une disponibilité en eau conséquente, un apport en azote et de l'énergie fossile. Des protéines de nouvelle génération arrivent sur le marché comme les protéines de microalgues, d'insectes et d'algues. Celles-ci représentaient plus de 8 milliards de part de marché en 2017.
Les microalgues comme la Spiruline, la Klamath et la Chlorelle peuvent être une source de protéines alternatives et de nombreuses entreprises les ont intégrées dans leur procédé de production. Corbion propose des ingrédients issus de microlagues notamment des poudres de protéines pouvant servir de matrice alimentaire et East India Distilleries (EID) Parry propose des ingrédients bio de spiruline, de chlorelle et des extraits d'autres microalgues. Les algues représenteront d'après Lux Research 20% de la part de marché des protéines alternatives à l'horizon 2050 (Fig. 2).

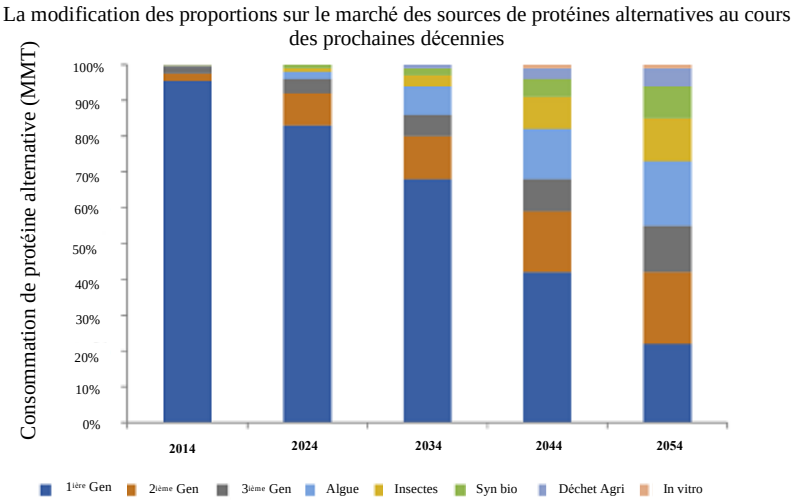


Figure 2. Évolution du marché des protéines alternatives à l'horizon 2050 (Lux Research 2014)

2. Les microalgues et extraits d'algues présents sur le marché

Grâce à leur composition biochimique, les microalgues peuvent être utilisées dans différentes voies d'application alimentaire, cosmétique, ou de la chimie verte. Les microalgues ont commencé à être commercialisées et produites à grande échelle dans les années 1960 au Japon avec la culture de Chlorelle par Nihon Chlorella, puis en 1970 la Spiruline était cultivée facilement dans le lac Texocco au Mexique par Sosa Texcoco SA. A partir de 1980 plus de 46 productions à grande échelle étaient comptabilisées en Chine, notamment de Chlorelle. Depuis plus de 30 ans le nombre d'industries de biotechnologie produisant des microalgues ne fait qu'augmenter (Spolaore et al., 2006).

I. Introduction et contexte de l'étude

La forte teneur protéique et la présence de molécules antioxydantes de certaines microalgues leur apportent un atout majeur et unique et leur permet d'entrer sur le marché de l'agroalimentaire et des nutraceutiques (Soletto et al., 2005). Le terme nutraceutique provient de la contraction de nutrition et de pharmaceutique. Sous ce terme sont commercialisés des poudres, pilules, gélules d'aliments naturels ou autres ingrédients qui englobent les vitamines, compléments alimentaires, oméga 3, algues, minéraux, antioxydants. Ce marché mondialisé est estimé à 205,39 milliards USD en 2016 et devrait atteindre environ 294,79 milliards USD en 2022 (Mordorintelligence, 2017). La demande en produits à effet santé ne fait qu'augmenter, les compléments alimentaires sont en forte expansion depuis 2011 aidés par les préoccupations montantes en matière de santé (tonus, minceur et immunité), du vieillissement ou tout simplement par la volonté d'un retour à des produits jugés plus naturels. Le taux de croissance annuel des compléments alimentaires est de 9,6 % de 2016 à 2024 et ce marché était évalué à 133,1 milliards de dollars en 2016 (Grand View Research, Inc, 2018).
De plus les compléments alimentaires constitués d'ingrédients de source marine sont une niche avec une croissance de 5,3% par rapport à 2015 (Synadiet, 2016). Un des leaders dans le domaine de la santé et de la nutrition, DSM commercialise des extraits de microalgues sous le terme d'ingrédient pharmaceutique actif comme des vitamines, des caroténoïdes et des acides gras polyinsaturés DHA et EPA. La phycocyanine (C-PC), le pigment bleu de la Spiruline est également employé en cosmétique ainsi que dans le domaine de la nutraceutique où elle est commercialisée comme antioxydant, anti-inflammatoire, agent neuroprotecteur ou hépatoprotecteur (García et al., 2017).

Les microalgues peuvent également intégrer le marché des colorants naturels représentant 5 à 10% du marché global des colorants et 55% du marché total des colorants alimentaires et cela devrait passer à 60% à l'horizon 2026 avec une valeur de marché estimée à 1,79 milliards en 2016. Depuis quelques décennies, l'industrie alimentaire mondiale utilise une quantité de plus en plus importante de colorants naturels ou artificiels. En France, ce sont près de 100 à 150 tonnes par an, surtout dans les conserves, les confiseries, les boissons, mais aussi dans la charcuterie, les fruits et légumes, les matières grasses (huile, beurre, fromage) et le sucre (Jespersen et al., 2005). La demande en colorant alimentaire naturel est en accroissement de 10-15 % annuel. De plus en plus de pays développés proclament l'effet néfaste des colorants artificiels sur le corps humain mais également sur l'environnement. C'est pourquoi, de nombreux pays ont interdit la synthèse et l'importation de colorant pur, ou des produits en contenant, ce qui encourage la production de pigments naturels (Agromedia, 2015; FMI, 2016). Afin d'être intégré dans les procédés de production industriels les colorants naturels doivent avoir des caractéristiques de résistance similaires aux colorants artificiels notamment dans les matrices de boisson où la couleur doit résister à la pasteurisation à des pHs acides (nutritionaloutlook, 2018).
Les entreprises présentes sur le marché des colorants naturels alimentaires sont nombreuses et les producteurs de colorants synthétiques ouvrent leurs gammes de colorants naturels, tel que Neelikon qui propose des colorants d'origines naturelles en plus de son large portfolio de couleurs alimentaires synthétiques comme la couleur orange-rouge du paprika, rose-rouge issue de l'anthocyanine de fruits rouges et violette de la betterave. BASF met sur le marché des pigments naturels comme la lutéine naturelle provenant de fleurs et Sensient Technologies Corporation présente de nouvelles formulations avec des colorants alimentaires naturels, l'anthocyanine issu des fruits rouges, le jaune du curcuma et le bleu provenant de la C-PC de Spiruline (futuremarketinsights, 2019).

Seulement 3 bleus chimiques peuvent être utilisés dans les produits alimentaires : le E131 uniquement autorisé comme additif en Union Européenne (UE), le E132 et le E133 approuvés

en Europe et aux États-Unis. Le colorant E133 est le plus utilisé pour sa stabilité sur un large spectre de pH. Il est difficile de trouver des pigments bleus dans la nature, cette couleur est rare autant dans le règne végétal qu'animal. La C-PC est un pigment photosynthétique d'origine naturelle présent chez les cyanobactéries et chez certaines microalgues telles que *Porphyridium*, *Rhodella*, *Galdieria* et *Glaucophyta* (Borowitzka, 1999; Sonani, 2016). Celle-ci peut représenter jusqu'à 15% de la masse sèche de la spiruline (Eriksen, 2016). La C-PC sous forme liquide ou en poudre peut être utilisée comme pigment bleu dans l'alimentaire. La C-PC extraite de spiruline est le seul pigment bleu naturel approuvé par l'US-FDA (US-Food and Drug Administration) (Doc No: 2013-19550 (Eriksen, 2016), en Europe le C-PC elle-même n'est pas dans la liste des additifs alimentaires autorisés dans l'Union Européenne (UE) mais la Spiruline fait partie de la liste des plantes autorisées dans les compléments alimentaires. En France la spiruline et ses composants sont autorisés à la consommation humaine depuis 1984, année durant laquelle le conseil supérieur d'hygiène publique a donné son approbation (Sguera, 2008). La C-PC de Spiruline se présente comme une alternative sérieuse au colorant bleu d'origine chimique comme le E131 et E133 dont l'innocuité est actuellement remise en doute (Lucová et al., 2013). Ainsi elle peut être utilisée en tant que colorant alimentaire naturel dans les glaces, bonbons ou boissons. En 2013, la FDA a soutenu la pétition du groupe Mars pour l'utilisation de ce photopigment de la Spiruline en l'autorisant comme premier colorant naturel bleu (FDA, 2013).

En 2018 le marché de la C-PC a été évalué à 112,3 millions US$ et une croissance de 2,02% est prévue pour 2028 aboutissant à une estimation de 232,9 millions US$ (www.futuremarketinsights.com). Le prix de la C-PC extraite de Spiruline dépend de son taux de pureté (Borowitzka, 2013) et se situe entre 135-200 US$/kg. La chine est le plus grand producteur mondial en fournissant 97% de la C-PC de Spiruline essentiellement commercialisée en Amérique du Nord, Europe occidentale et sur son marché intérieur (www.alibaba.com). Pour avoir une application alimentaire la C-PC doit avoir une pureté supérieure à 0,7 (Rito-Palomares et al., 2001) et certaines industries pharmaceutiques demandent un niveau de pureté bien plus élevé (Dasgupta, 2015).

II. ETAT DE L’ART

II. État de l'art

A. L'industrie de la Spiruline et ses limites

La spiruline fait partie du groupe des cyanobactéries, organismes présents sur terre depuis 3,5 milliards d'années et considérés comme produit de base de l'alimentation depuis l'antiquité au Chad (Abdulqader et al., 2000), chez les Kanembous, les Aztèques ou les Mayas en Amérique latine.

1. Taxonomie et habitats

La spiruline est le nom commun donné aux cyanobactéries du genre *Arthrospira*, un remaniement de la taxonomie a éliminé le terme *Spirulina*. Le terme "Spiruline" regroupe l'ensemble des espèces, de morphologie et de composition proches du genre *Arthrospira* dans l'ordre des *Oscillatoriales* et la famille des *Microcoleacea* (ANSES, 2017b). Le genre *Arthrospira,* comme toutes les cyanobactéries, appartient au règne des Eubactéries. C'est ainsi qu'elles ont une organisation de type procaryotique avec l'absence de noyau et la présence d'une paroi cellulaire de type Gram négatif. Elles possèdent la capacité de photosynthèse oxygénique grâce à la présence de chlorophylle a et de phycobilines. Elles s'organisent en succession de cellules formant des filaments spiralés.
Le genre *Arthrospira* est naturellement présent dans les zones intertropicales, dans les lacs alcalins en Afrique (Tchad, Éthiopie, Tunisie), en Amérique latine (Mexique, Pérou) et en Asie du Sud (Inde, Sri Lanka, Thaïlande). L'espèce la plus répandue en Afrique, Asie, Amérique du Sud est *Arthrospira fusiformis* alors qu'*Arthrospira maxima* est essentiellement localisée en Amérique centrale (Mexique et Californie). Dans son milieu naturel, la Spiruline se développe dans des eaux douces et chaudes (25°C), alcalines (pH 8-11,5), riches en carbonates, bicarbonates, nitrates, phosphates et fer, dans les lacs ou mares temporaires (Vonshak, 2014).

2. Composition cellulaire

La spiruline est composée de 60 à 70% de protéines, dont 47% d'acides aminés essentiels, les acides aminés soufrés étant légèrement sous-représentés. Parmi ces protéines, la C-PC représente entre 5-15% de la matière sèche. La teneur intracellulaire en glucides varie entre 14 et 19% de la matière sèche dont 12% de polysaccharides (Sguera, 2008; FAO, 2008). La quantité de lipides totaux est inférieure à 10% et principalement sous forme de di- et triglycérides. La spiruline est également composée de vitamines B (B1, B2, B3, B5, B6, B12), de caroténoïdes dont le ß-carotène et de vitamine E. Les cellules de Spiruline contiennent des minéraux tels que le potassium, le calcium, le chrome, le cuivre, le fer, le magnésium, le phosphore, le sélénium, le sodium, le zinc et le fluor et leurs quantités peuvent varier en fonction du mode de production. La chlorophylle a est la seule chlorophylle présente chez la spiruline et les cyanobactéries (ANSES, 2017) et la teneur en acides nucléiques constitue 4-6% de la masse sèche (Holman and Malau-Aduli, 2013; Gutiérrez-Salmeán, 2015; Bleakley and Hayes, 2017).

3. Production à l'échelle industrielle

Les microalgues peuvent être cultivées de différentes manières en fonction de leur métabolisme, elles ont besoin d'un apport d'énergie pour le fonctionnement de leur métabolisme et de leur division. L'énergie et le carbone apportés aux souches microalguales varient en fonction de leur mode trophique. En autotrophie, la lumière est la source d'énergie permettant l'excitation des photosystèmes conduisant à la photosynthèse et le dioxyde de carbone intervient comme source de carbone. Certaines microalgues peuvent se développer en absence de lumière, en

hétérotrophie et ont la capacité de métaboliser du carbone organique (Chen et al., 1996). Les cellules photoautotrophiques détenant les enzymes impliquées dans la transformation du pyruvate en acétate peuvent utiliser les polysaccharides de réserve et passer à un métabolisme fermentaire en absence de lumière et en anoxie. L'apport d'oxygène est néanmoins nécessaire pour une oxydation complète du glucose en dioxyde de carbone. L'apport d'oxygène en hétérotrophie permet une croissance cellulaire maximale (Hu *et al*., 2018).

a) Systèmes de cultures

(1) Culture en bassin ouvert (raceway)

La spiruline est produite à grande échelle en autotrophie dans des bassins à ciel ouvert (raceway), essentiellement dans des localisations tropicales et subtropicales autour de l'océan pacifique et dans les pays illuminés et chauds. L'essentiel de la C-PC présente sur le marché provient de Spiruline cultivée en photoautotrophie, méthode de production industrielle principale due à son faible coût d'investissement et à sa simplicité de conception. Les bassins sont remplis de milieu de culture d'une épaisseur comprise entre 10 et 30 cm et une circulation du liquide est créée par des pâles afin de permettre la pénétration et l'accessibilité à la lumière sur l'ensemble de la culture. Plus la culture est agitée plus les cellules ont des probabilités d'accéder à la lumière, élément essentiel à leur pigmentation. *A. platensis* tolère les conditions alcalines et croit à des pH élevés (pH 10,5), ces conditions extrêmes permettent une croissance à l'air libre en autotrophie tout en limitant la contamination par des organismes étrangers. La culture en bassin ouvert permet de produire entre 0,05 et 0,32 g/L/j de matière sèche et entre 0,003 et 0,024 g/L/j de C-PC (Querques *et al*., 2015). Un raceway de 27m^2 permet la production de 1 tonne de Spiruline par an avec une productivité de 0,0145 g/L/h et une consommation de 97 m^3 d'eau évaporée, ce qui représente plus de 10 fois le volume de culture du bassin (Radmann et al., 2007; Cruchot, 2008; Chisti, 2016).
Le système de culture en bassin est lié à plusieurs contraintes en étant notamment dépendant du climat et de l'ensoleillement. Ce système nécessite une grande surface de production et une quantité d'eau très conséquente (Ye et al., 2018).

(2) Culture en photobioréacteur

Un nouveau système de production de la spiruline autotrophe a émergé au début des années 2000, un réacteur équipé de système d'éclairage appelé photobioréacteur (Muller-Feuga et al., 2014). En photobioréacteur, la température est régulée et le maintien de l'axénie peut plus facilement être réalisé. Ce mode de culture permet d'augmenter la productivité de biomasse à 1,3 g/L/j ce qui est 20 fois plus performant que la production en bassin. La culture en régime continu est réalisable sur *A. platensis* en photobioréacteur, avec un taux de dilution de 0,018h^{-1} et une concentration cellulaire de 0,458 g/L ce qui permet d'obtenir une productivité de biomasse de 8,4 mg/L/h (Avila-Leon et al., 2012). Plusieurs systèmes de photobioréacteurs ont été créés et sont répertoriés dans la publication de Soni et al., 2017 comme les colonnes verticales, les plaques, les systèmes tubulaires et d'autres systèmes hybrides ou sacs plastiques. Le système le plus productif est le photobioréacteur tubulaire avec un taux de croissance pouvant être de 0,055h^{-1} mais les principaux désavantages de ce système sont la photo-limitation, l'accumulation d'oxygène, la limitation en dioxyde de carbone et la consommation électrique. Malgré un meilleur productivité, le mode de culture en photobioréacteur est pourtant peu développé à grande échelle car le coût de production est élevé, entre 18,7 à 74,3 €/kg alors que celui en bassin est de 3,9 à 9,6 €/kg (Soni et al., 2017). De plus l'apport de lumière naturelle ou artificielle doit être optimisé autour d'une valeur de 1500 µmol/m^2/s car une intensité plus

élevée provoque l'inhibition de la croissance de *A. platensis (Chen et al., 2010; Querques et al., 2015)*. Les essais de Chen *et al*., 2010 ont montré que la lumière bleue à 3000 $\mu mol.m^2.s^{-1}$ permettait une plus forte production spécifique de C-PC chez la Spiruline (Chen, 2010; Walter, 2011).

(3) Culture en bioréacteur

Quelques études montrent qu'*Arthrospira platensis* aurait également la capacité de croître en mixotrophie, c'est un mode de culture qui vise à apporter une source de carbone organique à la souche tout en lui amenant une source lumineuse. Le taux de croissance de la culture en mixotrophie avec du glucose correspond à la somme des taux de croissance en hétérotrophie et en autotrophie. La mixotrophie résulte à une augmentation du taux de croissance et de la concentration maximale en biomasse. Ce type de culture doit être réalisé en bioréacteur afin d'éviter la croissance d'un organisme contaminant qui provoquerait une compétition pour la source de carbone. Les performances de *A. platensis* en bioréacteur en mixotrophie atteignent une productivité en biomasse de 34 mg/L/h avec une teneur intracellulaire en C-PC de 107 mg/g_{MS} de masse sèche, ce qui permet d'obtenir une productivité en C-PC de 3,638 mg/L/h (Chen et Zhang, 1997) soit 36 fois plus qu'en autotrophie.

La capacité de croissance en hétérotrophie de la Spiruline a été testée sur 35 souches en présence de glucose ou de fructose, 34 se sont avérées capables de consommer le glucose et 24 le fructose (Mühling et al., 2005). Dans ces conditions de culture, une réduction de 53% de la production de C-PC est observée comparé à l'autotrophie, la teneur en C-PC chute à 57 mg/g_{MS}. *A. platensis* a une longue phase de latence en hétérotrophie (200h) et un faible taux de croissance ($0,0083h^{-1}$)(Marquez and et al, 1993; Chen et al., 1996; Chen and Zhang, 1997).

b) Milieu de culture

Le milieu de culture a un rôle essentiel dans le développement de tous microorganismes, celui de la Spiruline est décrit par (Zarrouk, 1966). La Spiruline est normalement cultivée à haute salinité, l'eau de mer est préalablement filtrée avant d'être insérée dans les bassins ou photobioréacteurs pour éviter la présence d'autres algues (Soni et al., 2017). L'élément présent en plus grande quantité est le bicarbonate de soude avec une concentration à 18 g/L. Le nitrate de sodium 2,5 g/L et le reste des nutriments nécessaires à la croissance de cette cyanobactérie sont apportés en plus faibles quantités (K, PO_4, Ca, EDTA, Mg, Fe…) (Walter et al., 2011). La teneur en fer détenue dans la biomasse de spiruline peut être augmentée en ajoutant dans le milieu de culture des sels de fer souvent complexés à l'EDTA (Ethylène Diamine Tétra Acétique) ou à l'acide citrique, cela permet de passer d'une concentration en fer dans la biomasse de 0,5 mg/g_{MS} à 1 mg/g_{MS}, il existe même sur le marché européen des spirulines titrant près de 6 mg/g_{MS} en Fe^{2+} (Belay et al., 1993).

c) Récolte

Les méthodes de récolte de la Spiruline influencent considérablement sa qualité nutritionnelle (Shao et al., 2019). Différentes techniques sont utilisées pour séparer la biomasse de Spiruline du milieu de culture, la centrifugation ou la précipitation chimique sont deux systèmes économiquement viables mais la filtration reste le procédé utilisé à grande échelle pour la production de Spiruline. Avec un système de filtration incliné, 95% de la biomasse est récoltée. La biomasse peut être rincée pour éliminer les sels avant d'être séchée. Différentes méthodes de séchage existent comme le séchage par le soleil, la lyophilisation, le séchage par atomisation

ou séchage à tambour. Les techniques les plus utilisées restent le séchage par le soleil ou l'atomisation dans le cadre de production industrielle. Les chips de Spiruline séchées au soleil peuvent ensuite être broyées en poudre ou bien compactées par pressage en tablettes ou granules (Soni et al., 2017). La Spiruline a une odeur et un goût caractéristique qui peuvent être repoussants, DIC a breveté un procédé de traitement de la Spiruline qui consiste à mélanger la Spiruline avec des bactéries lactiques (*Lactobacillus, Lactococcus*…) ce qui aboutit à une Spiruline avec un goût et une odeur plus agréable pour une utilisation alimentaire (Sakakibara et al., 2008).

4. La Spiruline une réponse aux besoins du marché

La production de Spiruline riche en protéines et C-PC surfe sur la vague des marchés émergeants et devient une industrie à part entière. L'Agence Internationale d'Énergie estime que la production annuelle de Spiruline séchée est de 10 000 tonnes, dont la moitié est produite en Chine (Ye et al., 2018). Le marché de la Spiruline a une croissance de 10% par an alors qu'aucune campagne de communication à grande échelle et auprès du grand public n'a été mise en place (consoglobe, 2017). Le coût moyen de la biomasse de Spiruline est de 30$US/kg et 70% de cette production provient de Chine, Inde et Taiwan. Un accroissement de ce marché est estimé à 2 000 millions d'euros pour l'horizon 2026 et semble dû à une augmentation de l'utilisation de la Spiruline comme matrice alimentaire, cosmétique et à son approbation comme colorant alimentaire naturel (García et al., 2017). La spiruline a été déclarée par l'« United Nations World Food Conference » en 1974 comme étant le meilleur aliment du futur et l'United Nations World Health Organization (WHO) présente la Spiruline comme un aliment intéressant pour de multiples raisons notamment sa richesse en fer et protéines (García et al., 2017). D'après l'UNESCO, la Spiruline est l'ingrédient le plus nutritionnel pour demain, la FDA l'a déclarée comme l'une des meilleures sources de protéines (Soni et al., 2017).

La Spiruline est considérée comme un aliment aux vertus nutritionnelles exceptionnelles notamment pour son taux de protéines élevé (60 à 70% de la masse sèche), son taux de fer, sa teneur en différentes vitamines et pigments et la digestibilité de ces protéines de 77,6% (Bleakley and Hayes, 2017). La spiruline est l'une des rares « microalgues » vendues pour son pouvoir nutritionnel, autorisée dans l'agroalimentaire elle se trouve sur le marché sous forme de complément alimentaire en pilule, poudre ou tablette (Nicoletti, 2016). La spiruline est préconisée contre les carences alimentaires, l'anémie, les rhumatismes, le diabète et le cholestérol (Piñero Estrada, 2001; Kulshreshtha et al., 2008; Sguera, 2008; Piccolo, 2011; Zeinalian et al., 2017). Elle est la seule microalgue avec la Chlorelle à être commercialisée comme « nutriment santé » (Borowitzka, 1999). Cette cyanobactérie peut également être incorporée dans un grand nombre d'aliments comme dans les pâtes, le pain, les biscuits, dans les boissons, bonbons ou bières et également dans l'alimentation animale (Eriksen, 2008; Batista et al., 2012). Hormis sa haute teneur en protéines, la Spiruline a une forte valeur ajoutée grâce à sa production en C-PC (Kumar et al., 2017).

De nombreuses entreprises produisent industriellement cette cyanobactérie, DIC est le plus important producteur de Spiruline mondial avec une production aux États-Unis sous le nom de Earthrise Farms qui couvre 437 060m^2 de bassins de production et une production annuelle de 550 tonnes. Un autre grand producteur est Cyanotech corporation qui a une production annuelle de 350 tonnes de Spiruline (Shao *et al*., 2019). Des substances contenant de la C-PC d'origine naturelle sont mises sur le marché par Cyanotech Corporation, PROzyme Inc ou bien DIC corp., Japon qui commercialise le « Lina Blue ® » (Borowitzka, 2013).

a) Les avantages et limites de la production de Spiruline

(1) Consommation autorisée

La Spiruline fait partie des 24 algues dont 3 microalgues autorisées en tant qu'ingrédient pour la consommation humaine en France (CEVA, 2014). Dans l'Union Européenne, la Spiruline est considérée comme une denrée alimentaire, elle est alors soumise au règlement (CE) N°396/2005 du parlement européen et du conseil du 23 février 2005 concernant les limites maximales applicables aux résidus de pesticides (Parlement européen et du conseil, 2005). *Spirulina major*, *Spirulina maxima* et *Spirulina platensis* sont les trois souches inscrites dans l'arrêté du 24 juin 2014 établissant la liste des végétaux autorisés dans les compléments alimentaires (JORF n°0163 du 17 juillet 2014) (Legifrance, 2014), sachant qu'aucune restriction, ni substance à surveiller ne sont évoquées dans cet arrêté. Aucune évaluation du risque de la consommation de Spiruline n'a été réalisée par l'Autorité européenne de sécurité des aliments EFSA (European Food Safety Authority) (Piccolo, 2011). Aux États-Unis les autorités sanitaires alimentaires représentées par la FDA classent la biomasse algale dont la Spiruline dans les « autres suppléments alimentaires » (Pulz and Gross, 2004). Elle est reconnue comme source de nourriture saine et classée GRAS (Generally Recognized As Safe) avec des doses de 0,5 à 3 g par portion (Fig. 3) (GRN No. 417) (Martinez-Garcia et al., 2017). Le codex alimentarius 2016 spécifie des concentrations maximales d'extrait ou de concentré de spiruline dans les aliments (0,5 à 2% m/m).

> Certified Organic Spirulina will be added to foods in the categories listed in the previous section, at a level of 0.5–3 grams per serving. If 10% of a person's daily food intake contained Certified Organic Spirulina, then the highest food consumers (based on the previously mentioned USDA article) would eat 1.82 servings of Spirulina per day. If we round this to 2.0 servings, then a high-end consumer is estimated to consume up to 6 grams per day of Certified Organic Spirulina. On the other hand, using this same methodology, a low-end food consumer is estimated to consume 1.25 servings of Spirulina per day, with a total exposure of approximately 3.75 grams per day. This is likely an over estimate, because, as discussed below, individuals tend to seek out Spirulina and Spirulina products, so a low-end user would likely consume very little of this ingredient.

Figure 3. Estimation de la consommation journalière en Spiruline (GRN No. 417)

(2) Inconvénients de cette production

Les problématiques de la production en bassins ouverts restent les contaminations externes que ce soit par d'autres microorganismes ou par des éléments métalliques. Certaines cyanobactéries peuvent produire de potentielles hépatotoxines (microcystines) et neurotoxines (García et al., 2017). Les genres producteurs d'hépatotoxines connus sont : *Microcystis*, *Azphanizomenon*, *Planktothrix* et *Dolichospermum*. Les neurotoxines peuvent également être produites par ces mêmes genres de cyanobactérie et par *Phormidium* et *Raphidiopsis*. Les données présentes dans la littérature ne permettent pas de conclure ni d'exclure le potentiel de production de microcystines hepatotoxiques par *Arthrospira spp*. (Gilroy and et al., 2000; El-Wahab and Moram, 2013; ANSES, 2017b). Des moisissures apparaissent régulièrement sur le flottant laissé longtemps sans agitation dans les cultures raceway, l'analyse bactériologique décèle couramment entre 5 et 500 colonies/g sans qu'aucune norme n'ait été imposée dans la plupart des pays. Les contaminants peuvent influencer la production de C-PC et notamment jouer sur

la pureté de celle-ci. La consommation de Spiruline contaminée peut produire des diarrhées, nausées et vomissements ainsi que des allergies et peut procurer des insomnies et anxiétés (M. Bishop and M. Zubeck, 2012; Querques et al., 2015; Shimamatsu, 2004). Récemment une méthode de détection par LC/MS/MS a permis de mettre en évidence la présence de microsystines dans 34 produits contenant de la Spiruline d'origine chinoise, des cyanotoxines ont été détectées dans ces compléments alimentaires contenant de la Spiruline de plusieurs origines et aboutissant à des effets indésirables recensés chez les consommateurs (Jiang et al., 2008; Manali et al., 2017; Roy-Lachapelle et al., 2017). L'ANSES recommande les circuits d'approvisionnement contrôlés par les pouvoirs publics (conformité à la réglementation française, traçabilité et identification du fabricant). De plus, la Spiruline a une forte capacité à fixer certains cations (cadmium, plomb, chrome, cuivre) il est donc nécessaire d'effectuer des contrôles sur les teneurs en métaux lourds des spirulines destinées à la consommation humaine. La présence de traces d'éléments métalliques (plomb, mercure, arsenic) à des concentrations dépassant les limites fixées par l'Union Européenne ou les spécifications de l'USP (dietary supplement compendium) a été rapportée dans des échantillons commerciaux de Spiruline. Les algues utilisées dans l'agroalimentaire doivent satisfaire aux critères figurant dans les deux tableaux 1 et 2 :

Tableau 1. Teneurs maximales en métaux lourds et en iode autorisées en France (Birand, 2009).

Élément	**Algues légumes ou condiments**
Arsenic minéral	3
Cadmium	0,5
Mercure	0,1
Plomb	5
Étain	5
Iode	2000

Pour les compléments alimentaires composés exclusivement ou principalement d'algues marines, la teneur en cadmium est fixée à 3,0 mg/kg dans le règlement européen n° 629/2008 (Commission européenne, 2008).
Les algues en sachet doivent respecter les critères microbiologiques pour les produits secs (avis du CSHPF et BID) :

Tableau 2. Critères microbiologiques pour les produits secs (avis CSHPF et BID)

Germes aérobies mésophiles	< 100 000 / g
Coliformes fécaux	< 10 / g
Anaérobies sulfitoréducteurs	< 100 / g
Staphylococcus aureus	< 100 / g
Clostridium perfringens	< 1 / g
Salmonella	Absence dans 25g sec

Les sources de protéines végétales sont nombreuses sur le marché et la Spiruline est en compétition avec les protéines de lait (origine animale), les protéines de levure et les protéines végétales comme les protéines de soja et de pois qui ont un coût de production compris entre 1$/kg et 25$/kg. Enfin malgré les nombreuses publications scientifiques faisant part des bienfaits santé de la Spiruline, aucune allégation santé n'est officiellement reconnue. La quantité maximale en bêta-carotène préconisée par l'ANSES (Agence Française de sécurité de l'alimentation, de l'environnement et du travail) est de 7 mg/j or la consommation de 5g/j de Spiruline (quantité maximale préconisée par certains compléments alimentaires) apporte 7 à 8,5 mg de β-carotène car la Spiruline en contient 1,4 à 1,7 mg/g (ANSES, 2017b).
Enfin la Spiruline n'est pas reconnue comme une source fiable de vitamine B12 car celle-ci est majoritairement sous forme d'analogue inactif (Watanabe, 2007).

B. La phycocyanine (C-PC)

1. Rôle dans la cellule et structure

Les Cyanobactéries, les Rhodophytes et les Cryptophytes détiennent un complexe photosynthétique avec un transport d'électrons au niveau de la membrane des thylakoïdes. Ce complexe inclut le phycobilisome (PBS), le photosystème II (PSII), le photosystème I (PSI), le cytochrome et l'ATP synthase (ATPase) (Fig. 5). Le PBS correspond à un complexe protéique associé à la membrane des thylakoides du côté du stroma et sert d'antenne collectrice pour le photosystème II (Collins et al., 2012)(Fig. 4).

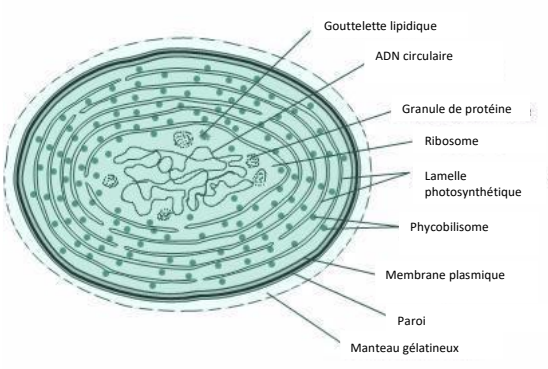


Figure 4. Schéma d'une cyanobactérie (sutori.com)

Ces complexes interviennent dans la chaîne de transfert des électrons impliquée dans la phase lumineuse de la photosynthèse. Ils ont également un rôle photoprotecteur afin de limiter les dommages causés par un excès de lumière. La composition et l'arrangement des PBS varient en fonction des organismes c'est pourquoi les mécanismes de transfert et de dissipation d'énergie au niveau des antennes sont extrêmement variables. Les PBS sont une forme de stockage d'acides aminés qui peuvent être accessibles par dégradation enzymatique en cas de carence (Collier and Grossman, 1992; Karradt et al., 2008). Ces PBS sont composés de phycobiliprotéines qui correspondent à l'assemblage entre une apoprotéine non chromophorique qui a un rôle structurel et d'un chromophore (Adir et al., 2002). Les PBS de de Spiruline sont constitués d'un corps d'allophycocyanine (APC) entouré par la C-PC en périphérie (Fig. 5). Les phycobiliprotéines absorbent l'énergie lumineuse dans une portion du spectre du visible (450-650 nm) et la transmettent rapidement au PSII puis PSI (Cuellar-Bermudez et al., 2015). Les réactions de transfert d'électrons sont couplées à la formation d'un gradient électrochimique au niveau de la membrane des thylakoïdes, ce qui permet la synthèse d'ATP par la pompe à proton ATPase (Liu, 2016).

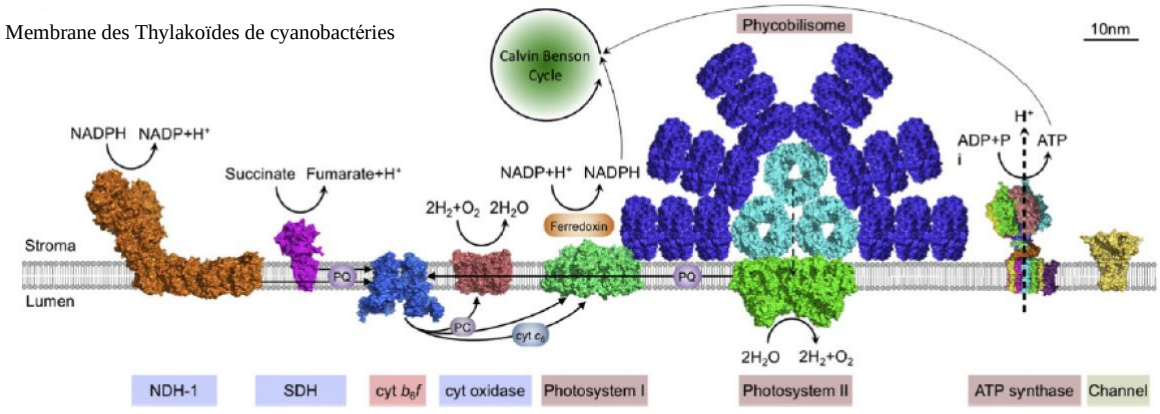


Figure 5. Schéma de la membrane des thylakoïdes de cyanobactéries (Liu, 2016). Trois types de phycobiliprotéines sont couramment observés, la phycoérythrine avec pour chromophore la phycoérythrobiline (PE) qui donne une couleur rouge, la phycocyanine (C-PC) et l'allophycocyanine (APC) avec pour chromophore la phycocyanobiline (PCB) qui donne une couleur bleue (Eriksen, 2016).

Ce pigment a un spectre d'absorption dans la lumière du visible avec un maximum entre 615 et 620 nm et un spectre d'émission fluorescent à 650 nm. Les chromophores sont constitués d'un noyau tétrapyrrolique ouvert relié à une apoprotéine par des ponts thioéther avec un résidu cystéine (Glazer, 1994). La C-PC est composée de deux sous-unités polypeptidiques différentes α et β, une PCB est reliée au niveau du résidu cystéine 84 de la sous unité α et deux PCB sont attachées à la sous-unité β par les résidus cystéine présents en position 82 et 153. La sous-unité α est comprise entre 13 et 20,5 kDa et la sous-unité β entre 11 et 24,4 kDa. La protéine de phycocyanine obtenue à partir de *Spirulina maxima* est de 121 kDa (α3β3). Le poids moléculaire de la chaîne α est 17,4 kDa et la chaîne β est 17,8 kDa (Boussiba and Richmond, 1979; Chaiklahan et al., 2012; Satyanarayana et al., 2007). En solution, la C-PC est trouvée sous forme de monomère, trimères (α3β3), hexamères (α6β6) ou autre oligomère (Cuellar-Bermudez et al., 2015) (Fig. 6).

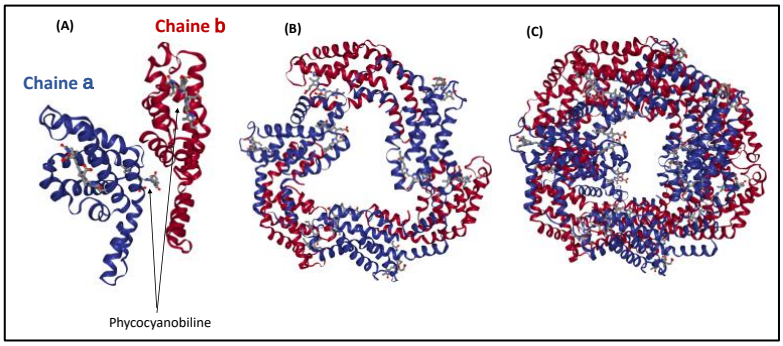


Figure 6. *Structure cristal de la phycocyanine de Galdieria sulphuraria (Fromme, 2009). A) Un monomère (1 sous unité α, 1 sous unité β et 4 phycocyanobiline) B) Un trimère (3 sous unités α, 3 sous unités β et 12 phycocyanobilines), un héxamère de dimère (6 sous unités α, 6 sous unités β et 24 phycocyanobilines).*

La morphologie des PBS varie en fonction des organismes. Chez la spiruline, l'énergie lumineuse absorbée par la C-PC est transférée par radiation à l'APC qui la transfère au centre de réaction du PSII et partiellement au PSI. L'assemblage du PBS est réalisé par un groupe de polypeptides nommés polypeptides « linker », elles agencent les phycobiliprotéines pour former la structure du PBS avec des antennes périphériques (C-PC) et un corps cylindrique (APC). L'APC forme le corps du PBS avec l'assistance de 3 types de linker polypeptides (LCM) intervenant dans l'interaction entre le PBS et les thylakoïdes, les linkers (LRC) interviennent dans l'assemblage des bras et du corps du PBS et les petits polypeptides linker (LC) participent à l'assemblage du corps de la structure (Sekar and Chandramohan, 2008). Les phycobiliprotéines (APC et C-PC) et les protéines linkers représentent 80% et 15-20% de la masse du PBS, respectivement (Liu, 2016; Sonani, 2016).

2. Synthèse de phycocyanine et régulation

a) Séquences des apoprotéines

Deux gènes codent pour les apoprotéines de la C-PC autant chez les cyanobactéries que chez les *cyanidiophycea*, un gène codant la chaine α et un gène codant la chaîne β de la C-PC (Jain et al., 2015; Schonknecht et al., 2013). Chez la Spiruline, les gènes *cpcA* et *cpcB* qui codent respectivement pour les chaînes α et β de la C-PC sont localisés dans l'opéron cpc et traduits à partir du même transcrit (Manen et Falquet, 2002).
Les séquences protéiques des chaînes α et β des organismes producteurs de C-PC varient entre les séquences de cyanobactéries et celles de *Galdieria sulphuraria* 074W. Dans la classe des

cyaniodiophycea, les séquences des chaines α et β de *Cyanidioschyzon merolae* n'ont que 82% et 83% d'identité avec celles de *G. sulphuraria* (Tab. 3).

Tableau 3. Comparaisons des séquences des apoprotéines α et β de C-PC de différents organismes (Cagnac, 2017)

	Couverture	%Identité
Galdieria sulphuraria Phycocyanin Chain A	**100%**	**100%**
Cyanidium_Caldarium_Chain_A	100%	98%
Cyanidioschyzon_merolae_Chain_A	100%	83%
Arthrospira_maxima_CS328_ Chain_A	100%	73%
Spirulina_Platensis_Chain_A	100%	73%
Arthrospira_jenneri_fz_Chain_A	100%	73%
Cyanobacterium_stanieri_PCC_7202_Chain_A	100%	76%
Halothece_sp._PCC_7418_Chain_A	100%	80%
Geitlerinema_sp._PCC_7407_Chain_A	100%	74%
Chroococcidiopsis_thermalis_PCC_7203_Chain_A	100%	83%
Nostoc_sp._PCC_7120_Chain_A	100%	80%

	Couverture	%Identité
***Galdieria sulphuraria* Phycocyanin Chain B**	**100%**	**100%**
Cyanidium_Caldarium_Chain_B	100%	99%
Cyanidioschyzon_merolae_Chain_B	99%	82%
Arthrospira_maxima_CS328_Chain_B	99%	76%
Spirulina_plantensis_Chain_B	99%	76%
Arthrospira_jenneri_fz_Chain_B	99%	76%
Cyanobacterium_stanieri_PCC_7202_ChainB	99%	79%
Halothece_sp._PCC_7418_Chain_B	99%	78%
Geitlerinema_sp._PCC_7407_Chain_B	99%	81%
Chroococcidiopsis_thermalis_PCC_7203_Chain_B	99%	82%
Nostoc_sp._PCC_7120_Chain_B	98%	83%

b) Voie métabolique de la phycocyanine

La PCB est synthétisée à partir de l'α-aminolevulinate ou acide 5-Aminolvulinique (ALA) qui est un précurseur des tétrapyrroles comme la chlorophylle, l'hème et la vitamine B12 (Liu et al., 2016) qui aboutit à la synthèse de l'hème qui sera ensuite inséré dans la C-PC apoprotéine par trois étapes enzymatiques (Beale and cornejo, 1991a, 1991b). Le cycle hème est oxydé par la biliverdine IX hème oxygénase pour être finalement converti en 3Z-phycocyanobiline (isomère de la PCB dominant) par la 3Z-phycocyanobiline : ferrédoxine oxydoréductase. L'insertion de 3Z-phycocyanobilin dans la C-PC apoprotéine via la formation de ponts thio-éther est catalysée par la PCB lyase (Eriksen, 2008). L'enzyme hème oxygénase qui catalyse la conversion du protohème en biliverdine IXα est liée à une ferrédoxine (Beale and cornejo, 1991a) (Fig. 7).

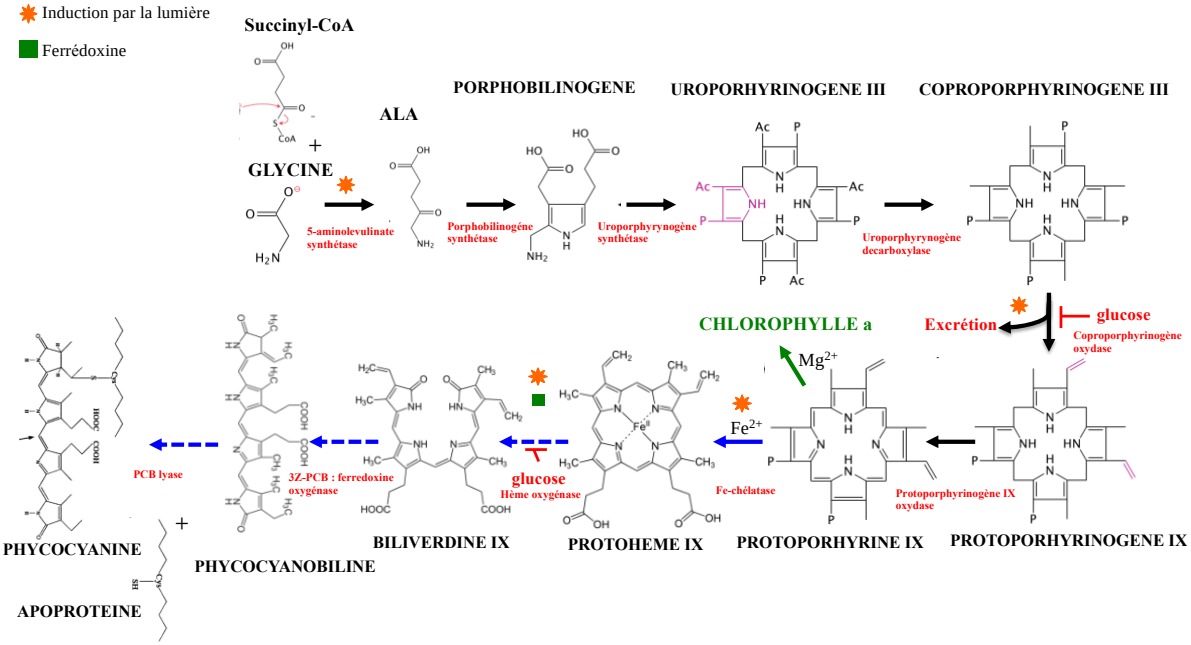


Figure 7. Voie de biosynthèse de la phycocyanine d'après (Brown et al, 1982; Troxler et al., 1989; Rhie and Beale, 1994; Stadnichuk et al., 1998).

La lumière induirait la formation de l'ALA, la biosynthèse de porphyrine et induirait l'activité de la ferrechelatase et hème oxygénase. Le glucose aurait un effet inhibiteur sur l'hème oxygénase et la coproporphyrinogène oxydase ce qui provoquerait une excrétion extracellulaire du copropophyrinogène III (Rhie and Beale, 1994 ; Stadnichuk et al., 1998).

c) Régulation de la synthèse de phycocyanine

Chez la Spiruline la lumière régule la synthèse de C-PC au même titre que d'autres facteurs tels que la température, la teneur en fer (Xing et al., 2007), en azote, l'oxygène (Beale, 1984) et le type de source de carbone (Eriksen, 2008). Cette régulation est peu connue chez les *Cyanidiophyceae*. Il est décrit chez *Galdieria sulphuraria* que la production de C-PC est influencée par la source de carbone organique : en présence de glucose la teneur en chlorophylles et phycobillines dans la cellule est réduite. Le D-glucose inhibe au niveau transcriptionnel la biosynthèse des phycobiliprotéines ce qui aboutit à une diminution de ces pigments et à une excrétion de coproporphyrine III dans le milieu de culture (Stadnichuk et al., 1998). Il est également constaté chez *G. sulphuraria* qu'une limitation en oxygène provoque une augmentation de la proportion en coproporphyrine avec le temps (Sarian et al., 2016).

3. Propriétés physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques de la C-PC dépendent de l'espèce et de l'habitat de celle-ci. Les phycobiliprotéines sont des pigments hydrosolubles contrairement aux chlorophylles et aux caroténoïdes qui sont des molécules hydrophobes.

Ce pigment est sensible au traitement à la chaleur ce qui peut provoquer sa précipitation ou une atténuation de sa coloration (Carfagna et al., 2018). La déstructuration de la C-PC est observée à des températures supérieures à 60°C, une agrégation des monomères (αβ) suggère la dénaturation de la phycobiliprotéine (Edwards et al., 1997). La dénaturation de la C-PC suite à un choc thermique est irréversible et celle-ci augmente entre 65°C et 95°C (Moon et al., 2014). La thermostabilité de la C-PC diffère selon les espèces productrices et dépend essentiellement

des interactions entre les acides aminés composant la structure de cette apoprotéine. La C-PC de *Synechococcus lividus* peut résister à des températures de 70°C (Edwards *et al*., 1997) et la C-PC de *Galdieria phlegrea* résiste à des températures de 70°C pendant 10 min (Carfagna *et al*., 2018). La C-PC de Spiruline reste stable jusqu'à des températures inférieures à 47°C pendant 30 minutes (Chaiklahan et al., 2012). De plus, l'addition de sucres permet à la C-PC de résister aux paramètres de pasteurisation du commerce (72°C pendant 15s) (Martelli et al., 2014; Cuellar-Bermudez et al., 2015), le glucose, le saccharose et le chlorure de sodium permettraient de prolonger la stabilité de la C-PC extraite (Chaiklahan et al., 2012).

Le point isoélectrique (pHi) des protéines correspondant à la valeur de pH pour laquelle la charge nette des protéines est nulle et où elles tendent à s'attirer, s'agréger et précipiter. Le pHi des espèces productrices de C-PC diffère. Une réelle séparation entre les cyanobactéries et les *Cyanidiophycea (Galdieria sulphuraria et Cyanidioschyzon merola)* est remarquée, notamment au niveau du pHi de la chaine α de la C-PC qui est proche de 2,2 pour les *Cyanidiophycea* et aux alentours de 4 pour les cyanobactéries (Cagnac, 2017). La C-PC de la Spiruline est hautement soluble à pH 7 mais insoluble à pH acides pour lesquels elle précipite, 25% de la concentration initiale est immédiatement dénaturée à pH 3 (Chaiklahan et al., 2012). La C-PC extraite de *Galdieria sulphuraria* a la capacité de résister à l'acidité jusqu'à un pH de 2,75 à température ambiante alors que dans les mêmes conditions, la C-PC de la Spiruline ne résiste pas à un pH inférieur à 4 (Cagnac, 2017).

Le trio température, pH et temps est déterminant pour la stabilité de la C-PC. Celle de la souche *G. sulphuraria* aurait la capacité de résister en partie à une température de 70°C à pH acide (Cagnac et al., 2017b) (Fig. 8)

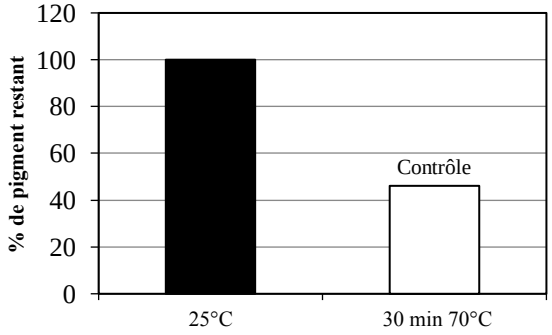


Figure 8. Résistance au pH acide et à la température de la phycocyanine extraite de Galdieria sulphuraria (Cagnac, et al.,2017). Barre noire : pH acide température 25°C 30min ; Barre blanche : pH acide, température 70°C, 30min.

4. Techniques d'extraction de la phycocyanine

La première étape de l'extraction de la C-PC a pour objectif de lyser les cellules afin d'avoir accès à la C-PC intracellulaire. Cette action peut être réalisée par différentes techniques et dépend de la composition de la paroi et de la membrane cellulaire du microorganisme. Les techniques de lyse connues sont le traitement thermique, la haute pression, les cycles de congélation décongélation, la lyse par azote liquide, par choc osmotique, le broyage par voie mécanique ou par ultrasons généralement en tampon phosphate à pH 7,2. La deuxième étape est une séparation solide/liquide consistant à isoler la C-PC du reste du contenu cellulaire, plusieurs techniques de séparation et purification existent comme notamment la séparation par gradient de densité, la chromatographie (échangeuse d'ions ou interaction hydrophobe) ou colonne d'élution, une précipitation au sulfate d'ammonium ou cristallisation suivi d'une

centrifugation ou ultrafiltration (Cruz de Jesús et al., 2016). La précipitation au sulfate d'ammonium est couramment utilisée est peut être réalisée à différentes concentrations en $(NH_4)_2SO_4$ (Sonani, 2016). Une concentration de $(NH_4)_2SO_4$ à 1,28 mol/l permet de précipiter la C-PC à une pureté de 0,7 alors qu'une précipitation à 25% ou 50% de sulfate d'ammonium permet d'atteindre une pureté de 1,18 à 4,14 (Cuellar-Bermudez *et al*., 2015; Moon *et al*., 2014). La méthode de filtration membranaire ou plus précisément d'ultrafiltration à filtre tangentiel est régulièrement utilisée pour l'étape de séparation et purification de la C-PC. La taille moléculaire de la C-PC étant généralement située entre 70 et 110 kDa, 50% de la C-PC est retenue à 100 kDa et 79% à 50 kDa (Jaouen *et al*., 1999 ; Chaiklahan *et al*., 2011). La combinaison d'un fractionnement par le sulfate d'ammonium avec d'autres méthodes comme la chromatographie échangeuse d'anions ou la filtration tangentielle, permet d'obtenir une pureté aux alentours de 3,5-4,5 (Cuellar-Bermudez *et al*., 2015).

5. Effet santé

Les propriétés pharmacologiques attribuées à la C-PC sont l'effet antioxydant, anti-inflammatoire (Pak et al., 2012), neuroprotecteur et hépatoprotecteur (Santiago-morales, 2018; Shao et al., 2019). Certaines maladies sont liées à la formation excessive de radicaux libres, la C-PC est capable de séquestrer ces radicaux notamment les radicaux peroxyl, alkoxyl et hydroxyl (Sekar and Chandramohan, 2008; Carfagna et al., 2015). La C-PC peut être ainsi utilisée à des fins thérapeutiques (Romay, 2003). Des essais *in vivo* sur des rats, souris et hamsters montrent que la C-PC peut avoir des propriétés anti-inflammatoires, hépatoprotectrices, neuroprotectrices, néphroprotectrices et peut également avoir un rôle protecteur sur les poumons et les yeux (Fernández-Rojas et al., 2014; Shao et al., 2019). La C-PC pourrait augmenter la durée de vie et la locomotion des personnes atteintes de la maladie de Parkinson grâce à sa capacité à réduire le stress cellulaire causé par les cellules endommagées (Kumar et al., 2017). La capacité antioxydante et potentiellement thérapeutique de la C-PC est due à sa structure moléculaire similaire à celle de la bilirubine (produit de dégradation de l'hémoglobine) qui est connue comme antioxydant naturel protégeant les lipides de l'oxydation. La bilirubine libre fonctionne comme un potentiel inhibiteur de l'activité de la NADPH oxydase et le chromophore PCB peut également avoir un effet inhibiteur sur ce complexe enzymatique étant donné qu'il est rapidement réduit en phycocyanorubine dans les cellules mammifères, un proche homologue de la bilirubine (Dasgupta, 2015). L'activité antioxydante de la C-PC proviendrait plus particulièrement du chromophore PCB. Une étude réalisée sur la C-PC de la cyanobactérie *Aphanizomenan flos-aquae* a mesuré l'effet antioxydant *in vitro* de la PCB séparée de l'apoprotéine et montre une capacité antioxydante en équivalent Trolox supérieure à la C-PC entière (apoprotéine + PCB) (Benedetti et al., 2010). La PCB aurait une activité antioxydante 30 fois supérieure à l'acide ascorbique et au glutathion selon la méthode ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) (Benedetti et al., 2010). La méthode ORAC reste une méthode *in-vitro* ne reconnaissant pas les capacités antioxydante *in-vivo*, pour cela une étude clinique est nécessaire (Onoja et al., 2014; Patro et al., 2016).

C. Une alternative à la Spiruline, les *cyanidiophyceae*

La Spiruline a une faible productivité en biomasse et/ou C-PC et la sécurité sanitaire des productions destinées à l'utilisation directe de biomasses en alimentation humaine ou animale n'est pas évidentes et nécessitent un contrôle qualité extrêmement précis. Cependant, le besoin en protéines végétales, en phycobiliprotéines et particulièrement en C-PC ou en biomasse contenant de la C-PC est conséquent. Le marché est demandeur d'une nouvelle source en protéines et C-PC produites par des méthodes de cultures contrôlées et pouvant permettre de contourner les inconvénients connus des cultures de Spiruline. Hormis les cyanobactéries, un autre groupe d'algues rouges, appelé Rhodophytes est connu pour posséder au niveau de leurs photosystèmes un pigment rouge la phycoérythrine proche de la C-PC (Ciniglia et al., 2004). Parmi ces Rhodophytes, il existe une sous-division, les *Cyanidiophytina*, qui sont constituées d'algues rouges unicellulaires (ARUs) qui vivent dans des sources d'eau chaudes acides (Doemel and Brock, 1971). Cette sous-division des *Cyanidiophytina* renferme la classe des *Cyanidiophyceae* regroupant des algues qui ont la capacité de produire de la C-PC et qui bien qu'appartenant au groupe des algues rouges présentent une couleur bleue verte similaire à celle des cyanobactéries.

1. Les *Cyanidiophyceae*, habitat et phylogénie

Les *Cyanidophyceae* ont été collectées dans des régions volcaniques, dans tous les continents excepté l'Afrique et l'Antarctique où elles n'ont pas réellement été cherchées. Elles ne sont pas uniquement trouvées dans les sources chaudes et acides mais également sur des rochers et des boues à côté des sources chaudes. Les caves ayant un microclimat spécifique stable (une température basse 4-10°C, un pH à 5-7, un haut niveau d'humidité et une faible intensité lumineuse) sont favorables au développement des *Cyanidiophyceae*. La classe des *Cyanidiophyceae* comprend un seul ordre, les Cyanidiales avec trois genres *Cyanidioschyzon*, *Cyanidium* et *Galdieria* (Fig. 9) qui peuvent vivre dans des habitats différents : *Cyanidioschyzon* domine clairement les environnements humides (ex : source et étangs) alors que *Galdieria* et *Cyanidium* sont souvent dans des endroits secs. *Galdieria sulphuraria* est connue pour être plus résistante à la carence en eau que *Cyanidium caldarium* (Reeb and Bhattacharya, 2010). Les souches de la classe des *Cyaniophyceae* ont été découvertes en premier par *Schwabe* dans des caves de la côte centrale et sud du Chili (Schwabe, 1936), puis Allen en a découvert en Californie (Allen, 1959) suivi de Friedmann en Israël (Friedmann, 1964), Skuja en Italie (Skuja, 1970), Leclerc en France (Leclerc and et al., 1983) et Ciniglia en Italie (Ciniglia et al., 2014). Certaines d'entre elles ont été collectées dans d'autres parties du monde notamment en Nouvelle Zélande, Mexique, États-Unis, Irlande, Japon ou au Kamchatka en Russie (Rossoni et al., 2018).

II. État de l'art

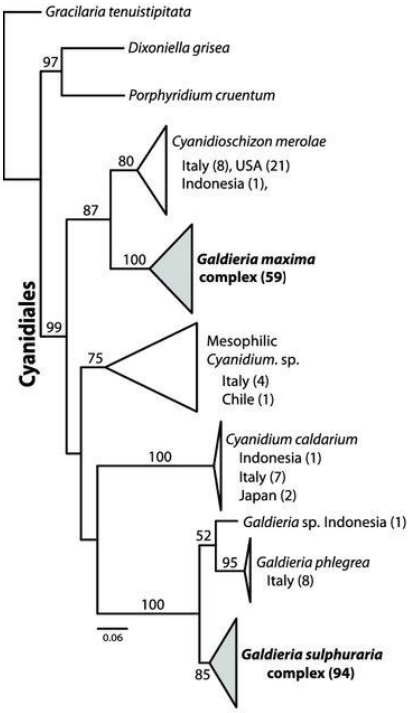


Figure 9. *Arbre phylogénétique créé à partir des séquences nucléotidiques du gène de la rubsiCo (rbcL) des Cyanidiophyceae (Ciniglia et al., 2014)(Analyse Maximum likelihood) ; le nombre entre parenthèse correspond au nombre d'isolat, l'échelle correspond au nombre de substitutions. Les séquences de Gracilaria, Dixoniella et Porhyridium appartenant à la classe des Florideophyceae, des Rhodellophyceae et des Porphyridiophyceae respectivement sont utilisées comme « outgroup »*

Galdieria sulphuraria est la représentante des *Cyanidiophyceae* qui a été la plus étudiée (Ciniglia et al., 2014). C'est une algue unicellulaire eucaryote contenant un chloroplaste distinct, une paroi cellulaire rigide et un noyau vésiculaire. Sa reproduction se réalise par fission binaire (Fig. 10).

Dans l'ordre des Cyanidiales la taxonomie a évolué au cours du temps. Avant les années 80, une confusion était faite entre *Cyanidium caldarium* et *Galdieria sulphuraria.* Le critère de différenciation entre ces deux espèces se base sur la capacité de croissance à l'obscurité pour *G. sulphuraria* alors que *C. caldarium* n'en a pas le pouvoir (Merola et al., 1981) ce qui révèle son autotrophie stricte (Reeb and Bhattacharya, 2010). Trois nouvelles espèces de *Galdieria* ont été identifiées en 1994 en fonction de leur morphologie : *G. daedala*, *G. maxima* et *G. partita* (Sentsova, 1994). Enfin l'espèce *G. phlegrea* trouvée en Italie est reconnue par sa différenciation au niveau du nombre de substitutions sur le gène codant le plaste rbcL (Ciniglia et al., 2014) (Fig. 9).

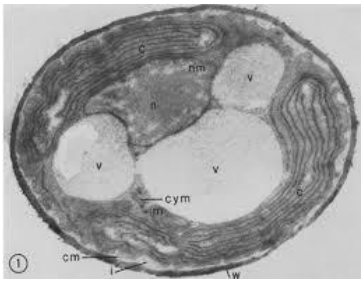


Figure 10. *Cyanidiales (cyanidium caldarium) en microscopie électronique à transmission (X40000) avec le noyau (n), le chloroplast (c), la mitochondrie (m) et les vacuoles (v). (Mercer, Boborad and Mullens 1962)*

2. Génome des Cyanidiophyceae

Deux génomes de Cyanidiales sont séquencés à ce jour ceux de *Cyanidioschyzon merolae (Matsuzaki, 2004) et de Galdieria sulphuraria* (Schonknecht et al., 2013 ; Davis et al., 2016). Deux génomes de *Galdieria sulphuraria* sont disponibles sur la base de données NCBI. Celui de la souche Indonésienne 074W GenBank ADNM00000000.2 a été séquencé et annoté dans le cadre du projet PRJNA13023 et le numéro d'échantillon est SAMN000112778 (Schonknecht et al., 2013). La taille de ce génome est de 13,7Mb avec 6723 gènes identifiés codant pour 7174 protéines. Rossoni en 2015 a ré-annoté ce génome à partir du séquençage de Schonknecht et en ajoutant des données RNASeq ; ce qui a permis d'obtenir un génome de 12,4Mb avec 183 contigs et 5171 transcrits identifiés. Cette ré-annotation a permis de diminuer le pourcentage de séquences non annotées à 26,6% au lieu de 35,3% pour l'étude de Schonknecht (Rossoni et al., 2018). Le second génome 107.79 correspond à une souche collectée par Allen en 1959 en Californie (Sonoma) dans des sources chaudes et acides. Le séquençage de ce génome a été réalisé dans le cadre du projet PRJNA330791 sur l'échantillon SAMN05426470 et a permis d'obtenir une taille de génome de 12,09Mb avec 117 contigs mais celui-ci n'a pas été annoté (Davis et al., 2016).
G. sulphuraria a une grande adaptation et flexibilité métabolique. Au moins 75 gènes sont issus de transferts horizontaux des *Archeae* et bactéries (Schonknecht et al., 2013). A peu près 50% des gènes de *Galdieria sulphuraria* contiennent un ou plusieurs introns (45-60pb), en moyenne 2 introns par gène (Gross et al., 2002) comparé aux autres espèces d'algues rouges qui en détiennent moins de 0,34. Cette différence serait liée à l'adaptation environnementale peu commune dont est capable la souche *G. sulphuraria* (Querques et al., 2015). Trente-trois gènes codent pour des enzymes intervenant dans la glycolyse et la glycogénèse ce qui expliquerait sa capacité à croître en hétérotrophie (Cloeter and Schönknecht, 2016). Les gènes de la glycolyse sont codés par le génome nucléaire. Le génome de *G. sulphuraria* contient aussi des gènes requis pour la biosynthèse et le stockage des sucres tel que le glycogène et le floridoside (Cozzolino et al., 2000; Pinto et al., 2003; Barbier, 2005; Martinez-Garcia and van der Maarel, 2016; Martinez-Garcia et al., 2017). Dans le génome de *G. sulphuraria* 5,2% des gènes codent pour des protéines de transports membranaires, chloroplastiques et mitochondriaux qui peuvent être des transporteurs primaires, secondaires ou des canaux ioniques. Vingt-huit transporteurs de sucres ont été identifiés chez *G. sulphuraria* (Barbier et al., 2005). Des transporteurs sont responsables du transport de sulfate et de cations ce qui permet à cette souche d'avoir une tolérance exceptionnelle aux ions métalliques toxiques (arsenic, aluminium, cadmium, mercure) (Schonknecht et al., 2013).

3. *G. sulphuraria*, les intérêts de cette souche micro-algale

a) Sa plasticité

Galdieria sulphuraria se développe dans des conditions de culture extrêmes, à des températures élevées et à pH acide ce qui facilite l'axénisation de cette souche et limite les contaminations microbiologiques externes (Gross and Schnarrenberger, 1995; Sloth et al., 2006; Wan et al., 2016a).
Galdieria sulphuraria est une souche mixotrophe, elle a l'aptitude de croître en autotrophie (utilisation de la lumière pour capter le CO_2 via la photosynthèse), en hétérotrophie (consommation de substrat organique carboné apporté par le milieu de culture) et en mixotrophie (substrat carboné organique apporté par le milieu et ajout de lumière). La souche 074G (variant de 074W) a un taux de croissance $\mu=0,01h^{-1}$ en autotrophie et un taux de croissance supérieur en mixotrophie ($0,044h^{-1}$) et en hétérotrophie ($0,04h^{-1}$) (Schmidt et al.,

2005; Sloth et al., 2017, 2006). Dans les conditions mixotrophe et hétérotrophe, la souche consomme un substrat organique, ce qui permet d'atteindre une concentration en biomasse plus importante. Cette souche n'est pas sélective pour ses substrats organiques de croissance, elle est capable de consommer un nombre important de métabolites carbonés, au total plus d'une 30^{aine} ont été dénombrés (glucose, glycérol, pentose…)(Oesterhelt et al., 1999).

La souche *G. sulphuraria* est versatile et a la capacité de s'adapter à son environnement. La souche originelle 074W, collectée à Java en Indonésie perd la majorité de ses pigments lors d'une culture en hétérotrophie et devient de couleur pâle. La sélection de colonie verte en hétérotrophie a permis d'identifier une souche 074G capable de rester verte malgré l'absence de lumière (Gross et Schnarrenberger, 1995). D'autres colonies de couleur bleu-vert ont été isolées sur milieu solidifié (20 g/l d'agar) à partir de la souche 074G. Les colonies apparaissent après 2 à 4 semaines de culture en incubateur à 42°C. Les clones variants sont identifiés par leur différence de pigmentation et sont transférés en milieu liquide. Les variants sont capables de produire une forte concentration intracellulaire en C-PC en hétérotrophie en présence de glucose (Graverholt and Eriksen, 2007).

b) Son mode de culture en bioréacteur

G. sulphuraria est citée dans la littérature pour son aptitude à produire de la C-PC et pour sa capacité à être cultivée en bioréacteur conventionnel permettant une production économiquement viable et une productivité en C-PC importante (Graverholt and Eriksen 2007). Le coût de production de biomasse microalguale en hétérotrophie est de 2$/kg alors qu'en autotrophie celui-ci est estimé à 11$/kg (Hu et al., 2018). *G. sulphuraria* cultivée en bioréacteur en hétérotrophie sur glucose peut produire 2909 mg/L de C-PC alors qu'*Arthrospira platensis* cultivée en autotrophie à bassin ouvert aura une concentration maximale en C-PC de 107 mg/L. *G. sulphuraria* a une productivité en C-PC de 1,7 à 13,6 fois plus élevée. Malgré une faible concentration intracellulaire en C-PC entre 3,6 et 30 mg/g de MS pour *Galdieria* sur glucose comparé à 60-74 mg/g de MS pour *Arthrospira*, sa forte densité cellulaire en bioréacteur lui permet d'obtenir des productivités en C-PC bien supérieures (Sorensen et al., 2013). Les meilleures production obtenues permettent d'atteindre une concentration cellulaire de 109 g/L de MS avec une concentration en C-PC de 2,9 g/L lors d'une culture en mode Fed-Batch en hétérotrophie sur glucose (Graverholt and Eriksen, 2007).

c) Son caractère nutritionnel

La composition cellulaire de la souche *G. sulphuraria* riche en protéines et en fibres laisse imaginer ses possibilités d'utilisation dans les préparations alimentaires, d'autant plus que cette biomasse cultivée en hétérotrophie est riche en vitamines notamment en riboflavine (Graziani et al., 2013). Des essais ont été réalisés en 2014 sur des rats supplémentés en *G. sulphuraria*, le but étant d'observer l'effet réducteur ou non du stress oxydatif de la souche. Cet article a pour la première fois, mis en lumière qu'une supplémentation alimentaire de *G. sulphuraria* diminuait les dommages oxydatifs des tissus induits par un exercice physique (Carfagna et al., 2015).

4. La culture de *G. sulphuraria*

a) Paramètres et modes de culture

La tolérance à l'acidité de *G. sulphuraria* fait partie de ses caractéristiques. Les cyanidiales ont la capacité de croître à des pH compris entre 0,05 et 5 mais leur optimum de croissance est à pH 2-3 (Doemel and Brock, 1971). Les souches de *G. sulphuraria* sont maintenues en autotrophie, en lumière constante (30-50 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}), à pH 2 sur un milieu sans carbone organique défini par Allen 1959 (Allen, 1959). En plus d'être résistante à l'acidité cette souche microalguale est thermorésistante, sa température optimale de croissance est située entre 45°C et 50°C. Incapable de réduire les nitrates, elle doit être supplémentée par de l'azote sous forme ammoniacale, acide aminé ou urée (Allen, 1959). En autotrophie, la souche est cultivée en présence de lumière avec un apport d'air supplémenté à 5% en CO2 et en mixotrophie une source carbonée organique est ajoutée. Les culture de *G. sulphuraria* en hétérotrophie et mixotrophie sont cultivées majoritairement sur glucose ou glycérol avec du $(NH_4)_2SO_4$ (Oesterhelt et al., 1999; Oesterhelt and Gross, 2002; Sloth et al., 2006; Graverholt and Eriksen, 2007; Christine Oesterhelt et al., 2007; C. Oesterhelt et al., 2007).

Le milieu de la culture en mode Fed-Batch ou continu peut détenir une concentration en glucose comprise entre 50-500 g/L et les concentrations des constituants inorganiques ajustées proportionnellement à l'augmentation de la concentration en carbone organique. La source d'azote est ajoutée à des concentrations comprises entre 11 et 110 g/L de $(NH_4)_2SO_4$ (Graverholt and Eriksen, 2007). A pH 2 le carbone inorganique dissous a une concentration aux alentours de 10 µM, alors qu'elle est de plusieurs mM à pH neutre ou alcalin. La culture de G. *sulphuraria* à pH acide complexifie la dissolution du CO_2 dans le milieu de culture (Christine Oesterhelt et al., 2007; Schmidt et al., 2005; Sloth et al., 2006).

b) Fonctionnement du métabolisme carboné

La souche *G. sulphuraria* est versatile et s'adapte au mode trophique et à la source de carbone apportée. Son temps de génération à 25°C est de 45 h en présence de saccharose, D-glucose, D-galactose, D-mannose et glycérol. Elle a une croissance un peu moins rapide avec du D-fructose, xylitol, D-xylose, D-lyxose, D- et L-arabinose. Un taux de croissance plus bas est déterminé sur adonitol, L-sorbose, D- et L-fucose, L-rhamnose, L-fucitol, L-glucose, 2-deoxy-D-galactose, L-xylose and meso-erythritol (Gross et Schnarrenberger 1995). Le temps de génération sur D-glucose passe à 14 h en augmentant la température à 37°C.

Le transfert de l'autotrophie vers l'hétérotrophie est suivi d'une phase de latence entre 1 et 45 jours en fonction du substrat du milieu (Oesterhelt et al., 1999). Ce même système d'induction du système d'absorption et des enzymes nécessaires pour la conversion du substrat ajouté peut être rapide d'autres organismes (ex : 60-80 min chez *Chlorella)* (Sauer and Tanner, 1989). Chez *Galdieria* la machinerie enzymatique permettant l'entrée de substrat dans le métabolisme cellulaire est exprimé constitutivement (Gross and Schnarrenberger, 1995; Oesterhelt et al., 1999). C'est seulement le système d'absorption (transporteur) qui est induit. Ce système d'absorption est induit par la présence du substrat dans l'environnement de culture et non pas par l'absence de lumière (Gross and Schnarrenberger, 1995). Plusieurs transporteurs peuvent être co-induits chez *Galdieria*, des traces de glucose suffisent pour induire le transporteur potentiel du ducitol par exemple (Oesterhelt and Gross, 2002). Cela indique la présence de transports non spécifiques et de faibles affinités (Hu et al., 2018). Ils transportent principalement le glucose, le galactose, le fructose, le glycérol, l'arabinose et le xylulose et des

mécanismes de symport proton/sucres ont été caractérisés. Le génome de *G. sulphuraria* contient au moins 4 gènes qui codent pour des perméases au glycérol de type aquaporine (Barbier, 2005). Trois groupes distincts de systèmes d'absorption sont repérés pour les hexoses, pentoses et polyols chez *G. sulphuraria* et un quatrième groupe celui des sucres desoxy existerait (Fig. 11). Chaque groupe contient différents transporteurs avec des affinités spécifiques au substrat.

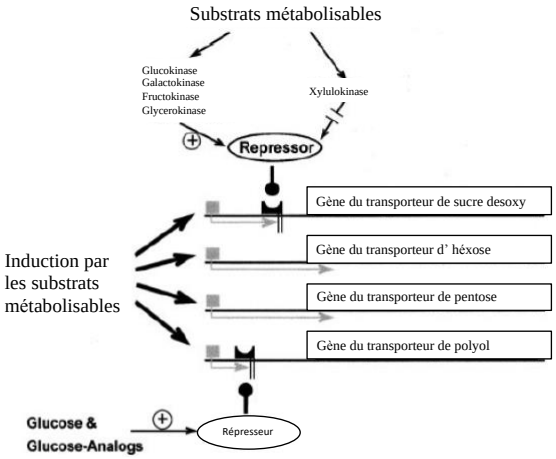


Figure 11. Modèle de régulation des transporteurs de sucres/polyol chez G. sulphuraria proposé par (Oesterhelt and Gross, 2002)

Les substrats métabolisés par l'intermédiaire d'une glucokinase, galactokinase, fructokinase ou glycerokinase aurait un effet répresseur sur le système de transport des sucres desoxy. Le glucose et ses analogues inhiberaient le système de transport des polyols (Oesterhelt et al., 1999). Des gènes codant pour des enzymes de digestion de glucide ont également été identifiés chez *G. sulphuraria* tel α et β galactosidase, α-glucosidase, mannosyl-oligosaccharide glucosidase et mannosidase (Barbier, 2005).

L'absorption des sucres chez *G. sulphuraria* est peu étudiée dans la littérature, en revanche une étude chez la Chlorelle a décrit trois transporteurs d'hexose nommés HUP. L'expression hétérologue dans *S. pombe* de ces trois transporteurs a permis de démontrer que HUP1 et HUP3 présentent une spécificité de substrats similaire et peuvent transporter le glucose, le fructose et le mannose alors que HUP2 transporte le glucose, le galactose et le xylose (Stadler and Sauer, 1996). Les K_m de ces trois transporteurs d'hexoses pour le 3-O-methyl glucose sont 1mM, 0,02mM et 0,4mM pour HUP1, HUP2, HUP3 respectivement lorsqu'ils sont exprimés dans *S. pombe (*Oesterhelt et al., 1999). Le K_m apparent du système d'absorption du glucose chez *Chlorella* est situé aux alentours de 10µM, chez *Galdieria* celui-ci est 10 fois plus élevé (105-140µM) (Gross and Schnarrenberger, 1995).

c) Répression de la phycocyanine par la source carbonée

La présence d'une source de carbone permet une croissance plus rapide de la souche *G. sulphuraria* cependant le contenu cellulaire en C-PC est bien moindre qu'en autotrophie. L'ajout d'une source de carbone dans le milieu de culture en présence ou non de lumière agit négativement sur la production de C-PC (Stadnichuk et al., 1998) et la présence de glucose dans le milieu inhibe la production photosynthétique d'oxygène (Moriyama et al., 2015). C'est pourquoi il est recommandé de réaliser les cultures de microalgues en bioréacteur à grande échelle selon un système Fed-batch et continu afin d'apporter la source de carbone organique

par intervalles de temps (Bumbak et al., 2011). Le coût de maintenance d'une culture de *G. sulphuraria* en continu est drastiquement réduit par rapport à celui d'une culture alimentée de manière discontinue (Graverholt and Eriksen, 2007). *G. sulphuraria* est capable de tenir un taux de dilution de 0,025 h^{-1} en continu en hétérotrophie, avec une alimentation contenant 50, 100 ou 150 g/L de glucose. Une culture en continu limitée en glucose et en excès d'azote permet une augmentation de la teneur intracellulaire en C-PC de 10 mg/g_{MS} à l'obscurité et de 25 mg/g_{MS} à la lumière. La stratégie d'ajout de glucose peut être basée sur la concentration en oxygène dissous dans le milieu. La carence en glucose provoque une augmentation de la pO_2 (pression partielle de l'oxygène dissous) ce qui initie l'ajout séquentiel du milieu d'alimentation et l'épuisement du glucose provoque une augmentation de la teneur intracellulaire en C-PC (Graverholt and Eriksen, 2007). Le type de substrat carboné utilisé influence la teneur intracellulaire en C-PC, en mixotrophie une culture avec du glucose ou fructose dans le milieu a une teneur intracellulaire en C-PC de 4-5 mg/g_{MS} qu'elle est de 8 mg/g_{MS} avec du glycérol (Sloth et al., 2006).

d) La lumière et ses contraintes

Malgré la sélection de variant producteur de C-PC en hétérotrophie, la lumière reste tout de même bénéfique à la pigmentation et la croissance des souches de *G. sulphuraria* en présence de substrat organique (Jenni K. Sloth, Wiebe et Eriksen, 2006). L'effet lumière sur la production de C-PC est différent en fonction du substrat utilisé. Une intensité lumineuse aux alentours de 100µmol photons.m^{-2}.s^{-1} stimule l'accumulation de C-PC sur des cultures en Batch glycérol, mais ceci n'est pas vrai sur des cultures en Batch sur glucose et fructose (Sloth et al., 2006). La culture en bioréacteur a pour avantage d'avoir une agitation de la culture optimale grâce à l'envoi d'air, l'axe rotatif et l'utilisation de contrepâle ce qui optimise le temps de séjour des microorganismes à la lumière (Querques et al., 2015). Un système hybride existe pour réaliser une culture en mixotrophie en bioréacteur en installant des tubes fluorescents dans l'enceinte du bioréacteur, l'intensité lumineuse dépend alors du nombre de tubes et permet de se positionner (0 et 395 µmol photons .m^{-2}.s^{-1}) (Sloth et al., 2006).

D. Les coproduits des procédés laitiers : des substrats alternatifs

Une analyse économique d'une production microalguale en bioréacteur montre que 17,5% du coût de production provient du substrat. Une solution potentielle pour réduire ce coût est d'utiliser les déchets et effluents industriels comme substrats (Querques et al., 2015). *Galdieria sulphuraria* est capable d'utiliser un grand nombre de substrats carbonés organiques, dont le lactose (Cagnac et al., 2017a). Les principales sources de lactose sont issues des produits et sous-produits de l'industrie laitière et fromagère. Une importante quantité de coproduits et d'effluents sont issus des procédés de production laitiers, plus de 180 millions de tonnes de lactosérum sont produits chaque année et seulement 50% sont valorisés (Baldasso et al., 2011), ce qui exige de trouver des solutions simples et économiques pour la valorisation de ces coproduits.

Le lactosérum est le coproduit résultant de la coagulation des protéines du lait pour produire du fromage. Dans ce lactosérum il y a certaines protéines résiduelles qui peuvent être séparées par un système de filtration, le coproduit de cette étape s'appelle le perméat de lactosérum ou perméat de fromage. La séparation par filtration des protéines de lait peut se faire directement à partir de cette matière première et ainsi le coproduit s'appellera perméat de lait (Fig. 12).

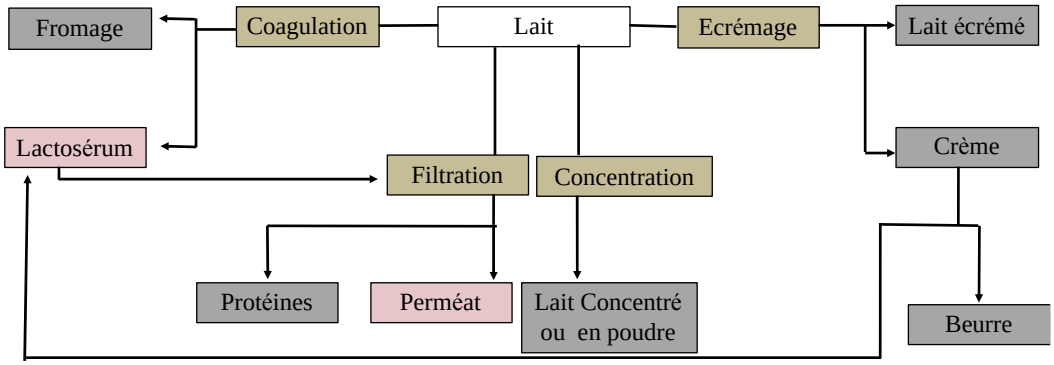


Figure 12. Schéma simplifié des produits et coproduits de l'industrie laitière.

1. Les problématiques de l'industrie laitière

La source principale de lactose provient de l'industrie laitière, 820 millions de tonnes de lait ont été produites dans le monde en 2015 dont 160 à 180 millions de tonnes de lactosérum. Les effluents produits par l'industrie laitière sont caractérisés par leur volume et leurs charges polluantes élevées. Bien qu'il existe des possibilités de valorisation du lactosérum, la moitié de la production mondiale n'est pas exploitée mais rejetée comme effluent, ce qui constitue une perte importante de matière alimentaire (Siso, 1996; Marwaha and Kennedy, 2007). Dans ces conditions, les coproduits laitiers comme le lactosérum représentent un problème environnemental très important dû aux volumes considérables générés (10^8tonnes/an) et à leur teneur élevée en matière organique (Fig. 13). Le lactosérum est un coproduit formé durant la coagulation des caséines du lait lors de la fabrication du fromage ou lors de la séparation des caséines. La composition et le type de lactosérum des usines laitières dépendent des types de fromages fabriqués, ainsi que des approches technologiques utilisées pour sa production. Deux types de lactosérum sont produits : le lactosérum acide (pH <5) obtenu suite à la production de caséine précipitée par adjonction d'un acide ou de présure et le lactosérum doux (pH 6-7) obtenu à partir de la fabrication de fromage à pâte pressée, semi-pressée, ou molle et de la caséine-présure (Bylund, 1995; Marwaha and Kennedy, 2007; Siso, 1996). Les nutriments du lactosérum les plus abondants sont le lactose, les protéines solubles, et les sels minéraux. Les sels du lactosérum sont composés de NaCl et KCl (plus de 50%), sels de calcium et phosphate principalement 134 mg/g et 121 mg/g respectivement et autres minéraux, en plus faibles teneurs Zn, Fe, Cu, Mn (Ramos et al., 2016). Le lactosérum contient aussi d'autres composants, tels que l'acide lactique (0,05 %) et citrique, des matières azotées non protéiques (urée et acide urique) et des vitamines du groupe B (Siso, 1996). Ce coproduit représente 85% du volume de lait transformé en fromage et contient 55% des constituants initiaux du lait, sa valorisation est un enjeu à la fois économique et écologique puisqu'il possède une Demande Chimique en Oxygène (DCO) de 50 à 70 g/L et une Demande Biochimique en Oxygène durant 5 jours (DBO_5) de 30 à 50 g/L ce qui en fait un produit polluant ne pouvant pas être rejeté dans la nature.

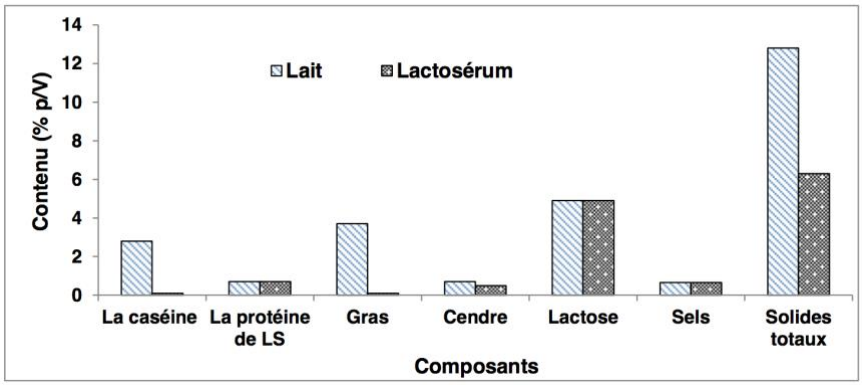


Figure 13. Comparaison des composantes du lait de vache et du lactosérum (Singh Yadav, 2014)

2. Impact des effluents laitiers sur l'écosystème, exemple de la Nouvelle Zélande

Le rejet des coproduits laitiers met en danger la structure physique et chimique du sol, diminue le rendement des cultures agricoles (McAuliffe et al., 1982) et réduit la vie aquatique par l'épuisement de l'oxygène dissous (Yang et al., 1980). La Nouvelle Zélande est le premier exportateur mondial de produits laitiers. Cette production utilise 1,8 millions d'hectares de terre ce qui équivaut à 7% de la surface de la Nouvelle Zélande. En 2016, plus de 5 millions de vaches à lait étaient associées à cette production (www.dairynz.co.nz). Ce nombre important de vaches et la quantité de produits laitiers fabriqués engendrent de larges volumes d'effluents nécessitant des systèmes de retraitement avant de pouvoir être rejetés dans la nature (Houlbrooke et al., 2004). Les rejets de cette industrie ont dans le passé provoqué des dérégulations de l'écosystème Néozélandais causant des eutrophisations des lacs et des blooms de croissance de cyanobactéries productrices de toxines (efflorescences algales ou « algal blooms ») (Wood et al., 2007, 2017). Le déversement de lactosérum dans les cours d'eau génère une diminution de l'oxygène dissous, des problèmes d'eutrophisation et de toxicité modifiant les propriétés physico-chimiques des écosystèmes aquatiques (Arevalo, 2017). Afin de diminuer les risques de pollution liés à ces rejets laitiers, la Nouvelle Zélande développe la production d'éthanol à partir du lactosérum (Das et al., 2016).

3. Les valorisations existantes

L'intérêt de la valorisation de ces coproduits est relativement nouveau. Cela résulte essentiellement de sa composition riche en protéines, en lactose et en vitamines hydrosolubles et de la pression exercée par la législation concernant les dispositifs liés aux effluents des usines (Bardy, 2016).

Les voies de valorisation des coproduits laitiers (lactosérum et perméat de lait) peuvent être séparées en deux grands domaines, la valorisation par traitement physique ou traitement biotechnologique utilisant les propriétés de microorganismes (Fig. 14).

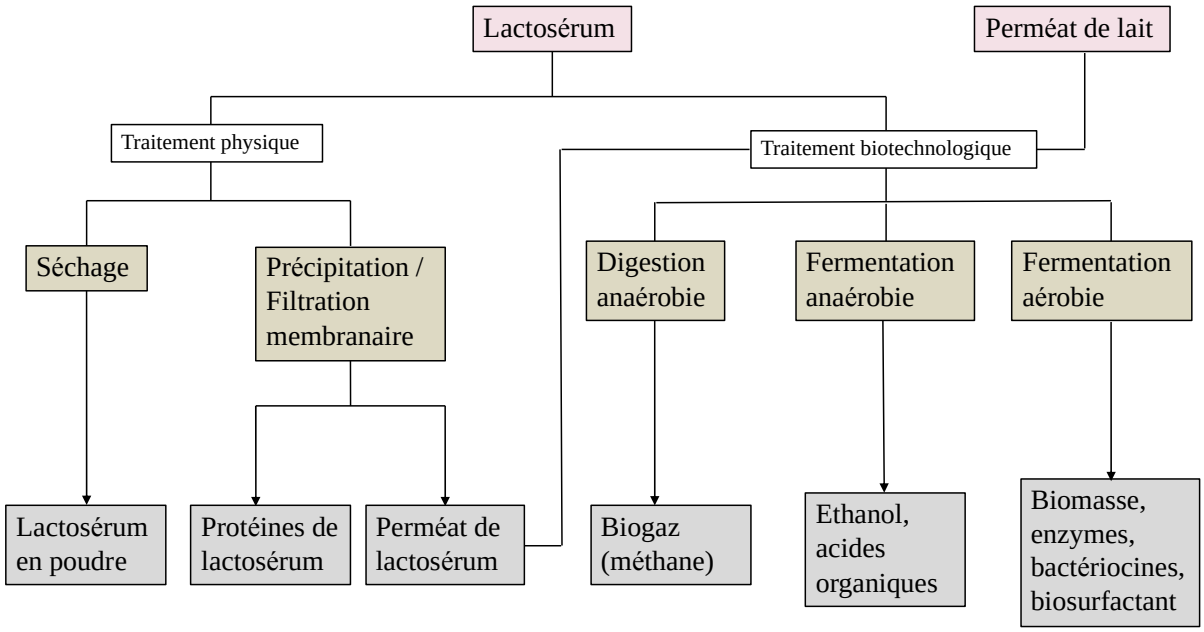


Figure 14. Voies de valorisation des coproduits laitiers, schéma créé à partir de Singh Yadav 2014.

a) Sous forme de poudre

Le lactosérum frais, sous forme liquide, n'est pas facilement valorisable pour la consommation humaine et n'est donc quasiment pas utilisé sous cette forme. La plus grande fraction du lactosérum est transformée en poudre par séchage afin de faciliter les manipulations et le transport, tout en maintenant les propriétés naturelles de ce produit sur du long terme (Siso, 1996). La poudre de lactosérum est utilisée directement dans l'alimentation animale et plus d'un million de tonnes est distribué chaque année aux porcs. De faibles quantités sont utilisées pour la nutrition humaine dans des glaces, cakes, sauces ou dérivés du lait (Bardy, 2016).

b) Les protéines du lactosérum

Les premières étapes dans la valorisation du lactosérum ont vu le jour dans les années 1970 avec la mise sur le marché des protéines de lactosérum, pour leurs propriétés technico-fonctionnelles et nutritionnelles particulièrement intéressantes en industrie alimentaire. Les protéines du lactosérum représentent 20% des protéines du lait (Hambraeus, 1982; Mulvihill and Fox, 1989; Guimarães et al., 2010). Le procédé d'extraction des protéines le plus ancien est la thermo coagulation. Cela consiste à porter à ébullition le lactosérum acidifié à pH 4,6-4,7 pour que les protéines précipitent. Leur récupération se fait par filtration ou décantation. Le problème de ce procédé est l'altération des propriétés fonctionnelles des protéines. L'ultrafiltration permet de récupérer les protéines du lactosérum tout en laissant passer le lactose et les sels minéraux dans le perméat. Cela permet d'obtenir des concentrés de protéines à 80% et n'altère pas la forme initiale de la protéine. L'ultrafiltration ou la diafiltration permet la production de concentrés de protéines de lactosérum (WPC) qui ont de nombreuses applications dans l'industrie agroalimentaire, la cosmétique ou les produits pharmaceutiques (Audic et al., 2003; Smithers, 2008).

C'est lors de ce procédé d'extraction des protéines de lactosérum qu'un large volume de perméat de lactosérum est produit, il peut être défini comme le sous-produit laitier provenant de la production de concentrés de protéines sériques par ultrafiltration à partir de lactosérum (Siso, 1996). Les procédés d'extraction des protéines de lait aboutissent également à une production accrue en perméat de lait résultant globalement à la même composition que celle du

perméat de lactosérum. Les concentrations en lactose et en acides organiques de ces coproduits peuvent varier. Le perméat de lactosérum est riche en lactose et a une charge environnementale élevée (DBO >25000mg/L) (Norton et al., 1994) et une faible valeur commerciale (environ 0,5$/kg de poudre) (Bentahar, 2018).

c) Lactose

Des procédés d'extraction du lactose présent dans le perméat de lactosérum ou le perméat de lait sont connus mais très couteux. L'extraction du lactose présent dans ces perméats laitiers peut être réalisée par un procédé de cristallisation permettant d'isoler le lactose sous forme de cristaux. La première étape consiste à concentrer les perméats par évaporation suivie d'une cristallisation par refroidissement et d'une séparation des cristaux. L'extraction du lactose peut être effectuée par l'alcool car le galactose engage sa fonction réductrice pour se condenser avec l'alcool, ce qui créé une liaison O-osidique qui lui permet de se lier avec le glucose et enfin obtenir du lactose. Le lactose est utilisé dans l'alimentaire comme sucre pur soluble à faible pouvoir sucrant, capable d'améliorer la texture des aliments ou des produits pharmaceutiques (Jelen, 2009). Il peut être utilisé comme substrat de culture pour les bactéries lactiques en charcuterie, confiserie, boulangerie ou pâtisserie (Bardy, 2016).

d) La valorisation énergétique

(1) Production de méthane

La méthanisation est une digestion anaérobie aboutissant à la dégradation de la matière organique par l'action de microorganisme tout en produisant du biogaz constitué de 60% de méthane, de dioxyde de carbone et d'eau (Fig. 15). Les déchets restant de ce procédé sont composés de matière organique non dégradée et des minéraux. La digestion anaérobique du lactosérum permet de passer d'une DCO de 65g/l à 6,5 g/L et d'une DBO de 45 g/L à 2,25 g/L. La production de biogaz à partir de lactosérum permet d'obtenir de l'électricité et de la chaleur, 1m^3 de lactosérum produit 265 kW de biogaz ou 100 kWh d'électricité et 100 kW de chaleur (Bardy, 2016). La valorisation des coproduits de l'industrie laitière par méthanisation peut apporter 512 $/j ce qui correspond à 186880 $/an (Kemp and Quickenden, 1989).
Le maintien de la biomasse bactérienne dans un digesteur est compliqué et les variations de charges sont difficilement tolérées par le procédé de méthanisation. En fonction des volumes de coproduits à digérer la taille des digesteurs doit être importante et les équipements de recirculation imposants (Bollon, 2012).

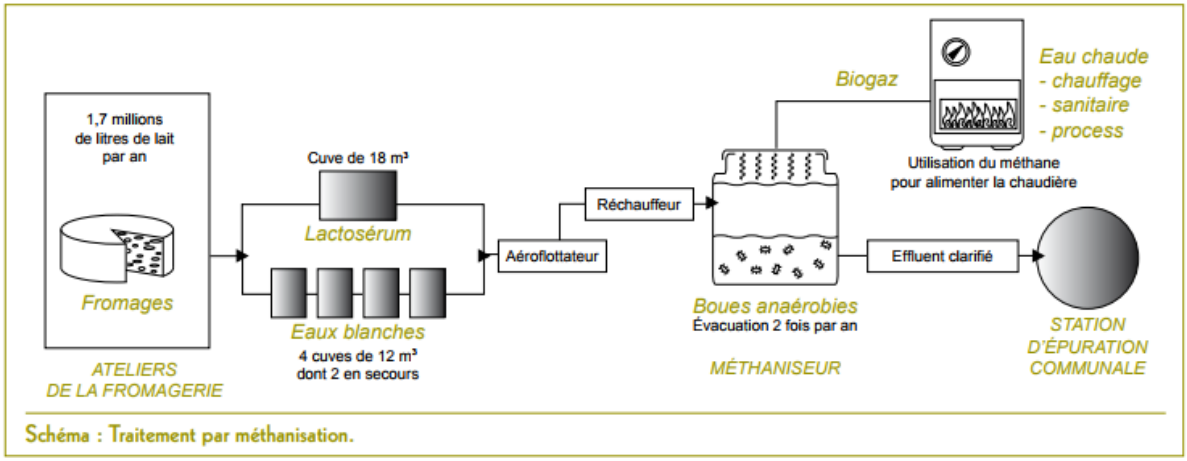


Figure 15. Schéma de traitement par méthanisation (De Glutz, 2009).

(2) Production d'hydrogène

Certaines bactéries comme *Clostridium*, *Lactobacillu*s et *Thermoanaerobacterium* sont capables de produire de l'hydrogène, alternative aux énergies fossiles sur des coproduits contenant du lactose (Prazeres et al., 2012). La digestion de perméat de lactosérum de fromage dans un réacteur UASB (Upflow anaerobic sludge blanket) a permis la production 8,1 mmolH_2/L/h tout en consommant 25 g/L de coproduit laitier (Davila-Vazquez et al., 2008). Le coût de la production d'hydrogène par les microorganismes reste supérieurs aux coûts des procédés traditionnels et aux coûts de la production d'électricité par les fermes éoliennes (Megret, 2015).

e) Substrat de fermentation

(1) Bioéthanol

La production de bioéthanol par des souches de levure est également un procédé très étudié depuis les années 1958 par la fromagerie Bel qui a mis en place un procédé à partir de lactosérum. La société Carbery en 1978 a développé le procédé « The Whey to éthanol » pour produire de l'alcool potable. Certaines levures ont la capacité de fermenter le lactose en éthanol tels que *Torula cremoris, Kluyveromyces fragilis, Kluyveromyces lactis, Kluyveromyces marxianus* et *Candida pseudotropicalis*. Le problème étant que ces organismes ne sont pas adaptés à des procédés fermentaires, ils ont une faible productivité de biomasse, une faible résistance aux fortes concentrations en sucre, un fort besoin en oxygène et peuvent être inhibés par la production d'éthanol. Une alternative serait d'hydrolyser préalablement le lactose (Espinosa-Gonzalez et al., 2014) et d'utiliser des levures à fort pouvoir fermentaire comme *Saccharomyces cerevisiae*, mais les étapes de prétraitement rendent ce procédé économiquement non rentable (Pasotti et al., 2017). L'étude économique de la production de bioéthanol par des souches de levures par fermentation (*Kluyvmeromyces marxiamus*) sur perméat de lait a été réalisée par De Glutz, 2009 où il attribue un coût de revient nul au perméat de lactosérum. Le coût de revient de ce coproduit dépend donc essentiellement de son coût d'acheminement sur la zone de production. Dans le cas où le perméat doit être transporté il est préférable de le concentrer à 22%, de le refroidir à 5°C pour éviter les contaminations microbiennes qui s'y développent rapidement due à la flore bactérienne consommatrice de lactose. La concentration optimale du perméat de lactosérum aboutissant à un coût de transport minimal est 300 g/L. Une des problématiques majeures de ce système de production d'éthanol est la présence de contaminants tel que les bactéries lactiques dans les coproduits laitiers qui consomment le lactose et réduisent la productivité en éthanol. Ce procédé n'est pas utilisé en routine aujourd'hui car il n'est économiquement pas rentable, les fortes concentrations en éthanol finissent par devenir inhibitrices de la croissance des levures, ce qui aboutit à un faible rendement et un coût de production élevé (De Glutz, 2009; USDA, 2014).

La bactérie *E. coli* peut être utilisée pour la production d'éthanol or cette bactérie a une faible productivité sur lactose, c'est pourquoi Pasotti et al., 2017 utilisent une *E. Coli* génétiquement modifiée pour augmenter la productivité en éthanol.

(2) Acides organiques, enzymes et autres composés

Le lactose présent dans les perméats lactés peut être converti en d'autres composés, tels que les acides organiques (acide acétique, propionique, lactique, citrique et succinique) obtenus par fermentation microbienne (Mehaia and Cheryan, 1986; Tejayadi and Cheryan, 1995).

La bactérie *E. coli* génétiquement modifiée qui a une forte capacité de croissance, consomme le lactose et produit un mélange d'acides organiques (Pasotti et al., 2017). D'autres bioproduits peuvent être issus de fermentation sur des coproduits laitiers comme les acides aminés (glutamique, lysine, thréonine), les vitamines, les polysaccharides, les lipides (huiles), les enzymes (β-galactosidase et polygalactorunase) et les autres composés (fructose-diphosphate, 2,3-butanediol, calcium magnésium acétate, ammonium lactate, butanol et glycérol). La production de ces diverses molécules constitue une des voies de valorisation des coproduits mais la faisabilité de ce type de production amène de nombreuses problématiques, comme la question de l'organisme producteur et du coût de revient du procédé en tenant compte du transport de ces coproduits (Siso 1996; Pesta, Meyer, et Winfried 2007; Prazeres, Carvalho, et Rivas 2012; Ramos et al. 2016). Le lactulose et le lactitol, reconnus comme prébiotiques, sont généralement produits par des réactions chimiques (Siso 1996) mais peuvent également être produits à partir du lactose grâce à l'action de la β-galactosidase de *Sulfolobus solfataricus*, *S. fragilis* ou d'autres microorganismes (Panesar and Kumari, 2011) .

(3) Protéines d'origine unicellulaire (P.O.U)

Le lactose des perméats lactés peut également servir à la production de protéines unicellulaires (P.O.U : peut être définie comme la biomasse des microorganismes). Les microorganismes utilisés traditionnellement dans le monde pour la consommation humaine comme P.O.U incluent les algues (*Spirulina, Chlorella, Scenedesmus, Dunaliela, Laminaria, Rhodymenia, etc.*), les bactéries (*Lactobacillus*, *Cellulomonas, Alcaligenes*, *etc.*), les champignons (*Aspergillus, Penicillium, etc.*) et les levures (*Saccharomyces, Candida, Kluyveromyces, Pichia* and *Torulopsis*) (Bekatorou, 2006). L'intérêt des POU dépend essentiellement de la quantité, qualité des protéines intracellulaires et de la digestibilité de la biomasse

Les bactéries ont un fort taux de croissance sur lactose, elles peuvent servir de POU à condition de limiter leur teneur en acides nucléiques pouvant aller jusqu'à 16% de leur masse sèche, sachant que la consommation maximale d'acide nucléique chez l'homme doit être inférieure à 2 g/j pour limiter les risques de calculs rénaux et de goutte. De plus, les bactéries gram négatif peuvent produire des endotoxines (Anupama and Ravindra, 2000).

Les levures sont régulièrement utilisées dans ce type de procédé car elles se développent facilement sur des substrats carbonés complexes, elles sont autorisées dans la réglementation alimentaire (GRAS) et elles contiennent moins d'acides nucléiques que les bactéries et ces acides ont des effets santé indésirables en augmentant le taux d'acide urique de l'organisme consommateur. Le problème principal dans la culture de levure est la production d'éthanol au détriment de la biomasse ce qui est dû à l'effet Crabtree ; à l'exemple de la souche consommatrice de lactose *K. marxianus* qui est classée Crabtree-négatif et qui ne peut croître qu'en anaérobie stricte ; or cette limitation en oxygène induit la production d'éthanol. De plus, la teneur en acides aminés essentiels des levures sur lactose n'est pas suffisante et la digestibilité de ces cellules est comprise entre 65 et 95% en fonction des espèces utilisées (Nasseri et al., 2011; Singh Yadav, 2014).

II. État de l'art

Les problématiques liées à l'utilisation de champignon comme POU sont liées au faible taux de croissance et à la production de mycotoxines par certaines espèces comme *Aspergillus parasiticus* et *A. Flavus* (Anupama and Ravindra, 2000)

Les microalgues sont intéressantes comme POU malgré leur faible taux de croissance car elle ont un taux d'acides nucléiques deux fois inférieur à celui des levures et leur profil en acides aminés est plus complet (Anupama and Ravindra, 2000). La croissance sur lactose de certaines microalgues a été testée mais ces essais n'ont pas été concluants. Une très faible augmentation de la masse sèche a été observée pour *Scenedesmus* sp dans le cas d'une croissance sur du perméat de lactosérum (Borges et al., 2016; Bentahar, 2018) alors que *Chlorella vulgaris* n'a pu assimiler directement le lactose (Abreu et al., 2012).

E. Objectifs du travail de thèse

L'espèce *Galdieria sulphuraria* a de multiples compétences. Elle détient une grande plasticité, elle peut consommer de nombreux substrats et être cultivée en bioréacteur. Sa composition intracellulaire à un fort potentiel nutritionnel et pourrait répondre aux besoins du marché en étant une nouvelle source alternative de protéines.

C'est en partant de ces constats que le projet de thèse à vue le jour avec pour objectifs :

-La mise au point d'un procédé de production en bioréacteur de la microalgue *Galdieria sulphuraria* en utilisant des coproduits de l'industrie laitière comme substrat de culture.
Pour cela il est nécessaire de :

- Sélectionner, cribler et caractériser une souche de *G. sulphuraria* à haute teneur en protéine et/ou en C-PC capable de consommer du lactose.
- Optimiser la croissance de cette souche en bioréacteur sur perméat de lait (PDL)
- Étudier la composition élémentaire de la souche en protéines, sucres de réserves, lipides, ions, vitamines
- Favoriser la production cellulaire de C-PC et mesurer l'impact du mode trophique sur le procédé de production.

-Caractériser les systèmes de transport de molécules carbonées chez *G. sulphuraria* afin de connaître les affinités et vitesses d'absorption de cette souche pour le lactose et d'autres substrats en vue d'adapter le procédé de production. Réaliser le suivi des cinétiques de transport sur cellule entière, évaluer l'impact du mode trophique sur l'absorption des sucres ainsi que la spécificité des systèmes de transport.

-Réaliser une étude d'expression différentielle afin d'identifier les gènes impliqués dans la production de C-PC et impliqués dans le transport de sucres. Identifier un transporteur de lactose chez *G. sulphuraria*.

-Pour finir transférer le procédé de production à une échelle pilote afin d'étudier la faisabilité et le potentiel industriel du projet.

-Évaluer les critères nutritionnels de la biomasse de *G. sulphuraria*

III. MATERIEL ET METHODES

III. Matériel et méthodes

A. Microalgues : Souche d'intérêt et variants

1. Souche d'intérêt

Le microorganisme utilisé est une souche de *Galdieria sulphuraria* issue de la collection d'algue de l'Université du Texas UTEX souche numéro 2919. Cette souche a été collectée par Mary Belle Allen de l'Université de Berkeley, Californie en 1959 (Allen, 1959).

2. Variants

Des variants naturels de *G. sulphararia* ont été sélectionnés à partir de colonies se développant sur milieu solide en chambre de culture à l'obscurité et à 37°C. Après 2 à 4 semaines de culture sur boîte de Pétri, les clones les plus pigmentés sont isolés et transférés en milieu liquide (Graverholt and Eriksen, 2007).
Les souches de *G. sulphuraria* FCC 3222 et FCC 3432 sont des souches issues de la souche UTEX 2919 et sélectionnées pour leur capacité à produire de la C-PC à l'obscurité. Les souches d'intérêt sont cryopréservées dans du tréhalose à 40% en utilisant un congélateur programmable (CBS Digitcool controlled rate Freezer Range, Cryolab Ltd) et elles sont maintenues par des repiquages sur boîte de pétri et en milieu liquide dans la collection de Fermentalg.

B. Milieux de culture

Ce milieu de culture a été mis au point par Fermentalg à partir des milieux décrits dans la littérature (Allen, 1959; Gross and Schnarrenberger, 1995 ; Cagnac et al., 2017b)

1. Milieu de culture solide

Le milieu de culture préparé à pH 3 et l'agar à 20 g/L sont stérilisés par autoclavage séparément puis assemblés avant de couler le mélange dans des boîtes de Pétri.

2. Milieu de culture liquide avec des substrats purs

Composition du milieu utilisé pour les cultures en fioles Erlenmeyers et pour le pied de cuve des cultures en bioréacteurs **:**

Tableau 4. Milieu de culture avec des substrats purs

Composés chimiques	Quantité
Source de carbone organique (lactose, glucose, glycérol)	30 g/L
$(NH_4)_2SO_4$	8 g/L
KH_2PO_4	0,25 g/L
$MgSO_4$, $7H_2O$	0,716 g/L
$CaCl_2$, $2H_2O$	0,044 g/L
$C_6H_5FeO_7$	0,0182 g/l
Solutions d'oligo-éléments concentrées Na_2EDTA 309g/L, $ZnSO_4$, $7H_2O$ 0,22g/L, $CoCl_2$, $6H_2O$ 0,04g/L, $MnCl_2$, $4H_2O$ 1,82g/L, $(NH_4)_6Mm_7O_{24}$, $4H_2O$ 0,03g/L, $CuSO_4$, $5H_2O$ 0,08g/L, $NaVO_3$, $4H_2O$ 0,04g/L, H_3BO_3 2,86g/L, Na_2SeO_3 0,017g/L	4 ml

Composition du milieu d'alimentation des cultures en bioréacteur utilisant un substrat pur :

La source de carbone organique est ajustée en fonction de la biomasse cible voulu et l'ensemble des autres éléments du milieu est apporté de manière proportionnelle en appliquant un facteur multiplicatif pour rester sur les mêmes rapports de concentration que dans le milieu pied de cuve.

3. Milieu de culture avec des substrats complexes : coproduits des industries laitières

La composition du milieu de culture utilisé pour les cultures en Erlenmeyers et pour le pied de cuve des cultures en bioréacteurs avec des coproduits de l'industrie laitière :

Tableau 5. Milieu de culture avec des substrats complexes

Composés chimiques	Quantité
Co-produits lactés en poudre (lactosérum acide, lactosérum doux, perméat de lait*, perméat de lactosérum)	30 g/L
$(NH_4)_2SO_4$)	8 g/L
$MgSO_4$, $7H_2O$	0,716 g/L
$C_6H_5FeO_7$	0,0182 g/L
Solutions d'oligo-éléments concentrées Na_2EDTA 309g/L, $ZnSO_4$, $7H_2O$ 0,22g/L, $CoCl_2$, $6H_2O$ 0,04g/L, $MnCl_2$, 4H2O 1,82g/L, $(NH_4)_6Mm7O24$, $4H_2O$ 0,03g/L, $CuSO_4$, $5H_2O$ 0,08g/L, $NaVO_3$, $4H_2O$ 0,04g/L, H_3BO_3 2,86g/L, Na_2SeO_3 0,017g/L	4 ml

*Le perméat de lait (PDL) utilisé lors de ce développement de procédé est composé de 4% de protéines, 0,1% de lipides totaux, 83,9% de lactose et 8% de cendres.

La composition des milieux d'alimentation des cultures en bioréacteurs correspond à une multiplication proportionnelle de l'ensemble des éléments du milieu pied de cuve. La concentration de lactose finale désirée guide la préparation du milieu. Pour une alimentation en continu, les milieux d'alimentation sont préparés en prenant en compte le rendement de production de biomasse sur lactose r_{MSL} afin d'aboutir à la concentration en masse sèche (MS) désirée lors de la stabilisation en régime permanent de la culture. Ce rendement r_{MSL} est calculé lorsque la souche n'a pas de limite nutritive.

C. Mise en culture des microalgues

1. Culture en Erlenmeyer

Les cultures en Erlenmeyers sont cultivées dans des incubateurs avec une agitation de 140 rpm, à 37°C, soit à la lumière (tubes néons blancs : 60 µmol/m^2/s) soit à l'obscurité.

L'effet de la nature de la lumière est étudié dans les mêmes conditions avec des LEDs de différentes longueurs d'ondes : 450 nm et 600 nm. L'intensité de ces LEDs est régulée par un générateur permettant d'obtenir des intensités lumineuses allant de 100 à 5000 µmol/m^2/s.

2. Culture en bioréacteur de laboratoire

a) Préculture

Les pré-cultures sont réalisées en fioles Erlenmeyer soit à la lumière pour une montée en échelle en mixotrophie, soit à l'obscurité pour une montée en échelle en hétérotrophie. Les pré-cultures n°1 (PC1) sont réalisées en doublon dans des fioles Erlenmeyers de 100ml avec une durée de culture de 96h moment où la souche est en phase exponentielle de croissance. Les PC1 sont utilisées pour inoculer à 10% les pré-cultures n°2 (PC2) qui sont réalisées dans des Erlenmeyers de 500ml en doublon également. Une des PC2 est utilisée après 96h de culture pour inoculer le bioréacteur de laboratoire avec un taux d'inoculation à 5%.

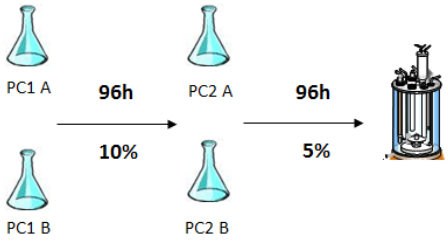


Figure 16. Schéma du chaînage de pré-cultures

b) Culture en bioréacteur de 2,5 L

Les cultures sont réalisées dans un fermenteur Pierre Guerin de 2,5 L utile, équipé de modules de mesure et de capteurs. de régulation de la température, du pH (sonde Mettler Toledo) et de pression partielle en oxygène dissous (sonde Mettler Toldedo). Le bioréacteur est connecté à un biocontrôleur. Le module d'entrée-sortie permet l'acquisition en ligne des données des capteurs (vitesse d'agitation, température, pH, pO_2) du temps de fonctionnement des pompes de liquides régulateurs de pH et d'antimousse ainsi que de la commande des pompes d'alimentation en substrat. Pour une culture à la lumière une contre-pâle lumineuse en verre détenant des LEDs est insérée dans le bioréacteur (Fermentalg, 2017), l'intensité maximale apportée est de 3W/L. Les milieux sont stérilisés par autoclavage en bouteille à 121°C pendant 20 minutes, puis transvasés dans le fermenteur par piquage stérile. L'alimentation en substrat carboné est assurée par une pompe péristaltique commandée par le logiciel Neptune. Le pH est régulé à 3 par addition d'une solution concentrée d'ammoniaque (14%) ou d'acide sulfurique (4N) et la température est régulée à 37°C.

3. Culture en bioréacteur de type industriel

Le procédé de culture en condition de type industriel est mis en œuvre dans un réacteur (Fujitsu) de 148 litres de capacité volumique, stérilisable sur site. L'agitation est réalisée par deux turbines Rushton équi-répartis sur l'axe. La présence de trois piquages en plus des piquages associés aux capteurs permet la réalisation d'ajout de solution au cours de la fermentation.

III. Matériel et méthodes

a) Capteurs

Le bioréacteur est équipé d'une sonde température, d'une sonde à oxygène dissous (Mettler Toldedo), d'une sonde pH (Mettler Toldedo), d'un capteur de pression et d'une sonde de niveau (Vegacal 63, Vega). La sonde à oxygène dissous permet de mesurer la pression partielle en oxygène dissous dans le moût de fermentation et peut être commandée par une consigne de sécurité maintenant l'apport en oxygène dissous au-dessus de 30% afin que ce paramètre ne soit pas limitant. La régulation de la température est assurée par une double enveloppe, celle du pH se fait via deux pompes péristaltiques (Masterflex) apportant respectivement une solution basique (ammoniaque 14%) et une solution d'acide (acide sulfurique 4N). Une troisième pompe péristaltique permet l'adjonction séquentielle d'anti-mousse (Biospumex 153K).

b) Solution d'alimentation et régulation pH

La solution d'alimentation est préparée dans une cuve de 100 L stérilisable sur site (Fujitsu). Des pompes péristaltiques sont dédiées à l'ajout d'alimentation, d'ammoniaque ou d'acide et sont commandées par l'intermédiaire du logiciel Neptune.

c) Logiciel de commande

Les capteurs de mesure en ligne et les pompes péristaltiques sont connectés à un ordinateur de type PC par une interface Analogique/Digital-Digital/Analogique et des ports série type RS 232. Les différents paramètres peuvent être suivis en ligne : température, pH, Oxygène dissous, pression relative, agitation, volume dans le bioréacteur, débit massique d'aération, débit de pompe d'alimentation, débit de pompe de régulation pH.
L'acquisition en ligne des données par les capteurs permet de créer des commandes de fonctionnement des pompes d'alimentation, de régulation pH et d'ajout d'anti-mousse.

d) Stérilisation en place du milieu de culture

Les procédés de production exigeant une asepsie complète de l'environnement de culture en bioréacteur, il est préférable de procéder à une stérilisation en place du milieu de culture. Les éléments du milieu de culture sont assemblés dans une cuve inoxydable avant d'être stérilisés par injection temporisée de vapeur d'eau pure, la cuve étant à une pression relative de 1 bar.

4. Conduite de culture

Deux modes de conduite en bioréacteurs ont été utilisés au cours de ce travail. Le premier est un mode d'alimentation discontinu par Fed-batch qui consiste à ajouter du milieu stérile en cours de culture pour augmenter la concentration cellulaire. Le second est le mode d'alimentation continu en chémostat qui consiste à ajouter du milieu de culture neuf à un débit constant tout en délestant le bioréacteur de la biomasse microalgale au même débit. Quel que soit le mode d'alimentation utilisé la culture en bioréacteur commence par une phase Batch (apport du milieu pied de cuve en une seule fois en début de fermentation) puis se poursuit par la phase Fed-batch correspondant à une alimentation exponentielle en continue. Cette stratégie d'alimentation permet d'apporter les nutriments et notamment la source de carbone selon les besoins du microorganisme sans en accumuler dans le milieu de culture, ainsi la teneur en carbone organique résiduel est proche de 0 g/L.

III. Matériel et méthodes

La phase Fed-Batch permet d'atteindre la concentration en masse sèche escomptée, la culture peut ensuite être poursuivie en mode chémostat avec un débit d'alimentation déterminé en fonction du taux de croissance désiré. La densité cellulaire de la culture en chémostat sera fixée par la concentration en source carbonée organique dans l'alimentation.

a) Détermination du profil d'alimentation exponentiel

La composition du milieu d'alimentation est ajustée de manière à ce que l'élément limitant soit la source carbonée organique ainsi le débit d'alimentation peut être calculé afin que la culture suive une croissance exponentielle.
Il y a une limitation de la source carbonée imposée par le débit d'alimentation et la concentration résiduelle en carbone se voulant constante et nulle, le taux de croissance imposé dans ce mode de culture est constant.
Les données nécessaires à la mise en place d'une alimentation exponentielle sont déterminées au cours de la culture Batch : taux de croissance μ (h^{-1}) et rendement r_{MSS} (g_{MS}/g_S)

Le bilan de matière sur un bioréacteur s'écrit selon l'équation suivante :

$$d(S.V)/dt = V.dS/dt + S.dV/dt = -(\mu/Y_{MSS} + m).MS.V + dV/dt.S_{alimentation} \quad \text{Équation 1}$$

où S est la concentration en substrat (g/L), MS correspond à la concentration en biomasse (g/L), V au volume de la phase liquide du bioréacteur (L), Y_{MSS} le rendement théorique limite, m le coefficient de maintenance cellulaire ($g_S/g_{MS}/h$) et $S_{alimentation}$ (g/L) la concentration équivalent en substrat dans l'alimentation.
La variation du volume de culture prend en compte les volumes de substrats ajoutés et les volumes de biomasse soutirés pour les analyses.

$$Q(t) = d(V)/dt \quad \text{Équation 2}$$

ainsi l'équation 1 devient :

$$d(S)/dt = -(\mu/Y_{MSS} + m).MS + Q(t)/V.(S_{alimentation}-S) \quad \text{Équation 3}$$

Or la concentration résiduelle en substrat se voulant stable d(S)/dt = 0

$$d(S)/dt = -(\mu/Y_{MSS} + m).MS + Q(t)/V.(S_{alimentation}-S)=0$$

$$Q(t)= (\mu/Y_{MSS} + m).MS.V/(S_{alimentation}-S) \quad \text{Équation 4}$$

Une fonction exponentielle à taux de croissance constant est exprimée sous l'équation 5.

$$MS(t).V(t)= MS_0.V_0.exp^{\mu.t} \quad \text{Équation 5}$$

$$Q(t)= (\mu/Y_{MSS} + m). MS_0.V_0.exp^{\mu.t} /(S_{alimentation}-S) \quad \text{Équation 6}$$

Avec un m constant le rendement en biomasse (r_{MSS})=$\mu(\mu/Y_{MSS}+m)$ ainsi l'équation 6 devient

$$Q(t)= \mu/r_{MSS} . MS_0.V_0.exp^{\mu.t} /(S_{alimentation}-S) \quad \text{Équation 7}$$

b) Détermination du débit d'alimentation pour un chémostat

Le bilan de matière pour le substrat sur le volume de moût est défini par l'Équation 8

$$d(S.V)/dt = Q_{alimentation}.S_{alimentation}-Q_{sortie}.S+rs.V \quad \text{Équation 8}$$

Dans le cas d'un régime permanent S et V sont stables donc d(S.V)/dt =0
De plus lorsque la concentration en substrat imposée est nulle, l'Équation 8 devient :

$$Q_{alimentation}.S_{alimentation} +rs.V =0 \quad \text{Équation 9}$$

La vitesse volumique relative à la consommation du substrat r_S (mole/L/h) et la vitesse spécifique de consommation du substrat q_s (mole/g_{MS}/h) sont définies par l'Équation 10 et l'Équation 11 respectivement.

$$r_S = (Q_{alimentation}.S_{alimentation}-Q_{sortie}.S+ d(S.V)/dt)/V \quad \text{Équation 10}$$

$$q_S=r_S/MS \quad \text{Équation 11}$$

Dans le cas d'un régime permanent :

$$r_S= (-Q_{alimentation}.S_{alimentation} + Q_{sortie}.S)/V \quad \text{Équation 12}$$

Et lorsque S=0 :

$$r_S= (-Q_{alimentation}.S_{alimentation})/V \quad \text{Équation 13}$$

$$Q_{alimentation} = -rs.V/S_{alimentation}$$

D. Techniques analytiques

1. Caractérisation de la biomasse

a) Densité optique

Le suivi de croissance peut être réalisé par mesure de l'absorbance à 800 nm, longueur d'onde où la C-PC et APC n'absorbe pas. Si nécessaire, les échantillons sont dilués avec de l'eau stérile pour obtenir des mesures d'absorbance comprise entre 0,1 et 0,8.

b) Matière sèche

Après filtration d'un volume connu d'échantillon (1 à 4 ml) sur une membrane (Millipore® glass-fiber filters, AP series Merck milipore) de porosité 0,7 µm préalablement séchée et pesée, la membrane est rincée par une solution d'eau adoucie, séchée à l'étuve sous vide (110°C) pendant 24 heures et pesée. La masse sèche de la biomasse est déterminée par la différence entre les deux pesées et réajustée par rapport au volume filtré.

2. Composition cellulaire

a) Phycocyanine (C-PC) et allophycocyanine (APC)

La C-PC et l'APC sont mesurées par absorbance après avoir été extraites de la cellule. La biomasse cellulaire est centrifugée (4000g pendant 5 minutes) lavée à l'eau ultra pure et lyophilisée. La biomasse lyophilisée est broyée à sec au Tissue lyser 6 minutes à 30 Hz, celle-ci est ensuite reprise dans un tampon Tris-HCl pH 7,5 et laissée incuber 10 minutes à température ambiante. Le tout est congelé à -80°C puis décongelé, centrifugé à 21130 g pendant 5 min. et des mesures d'absorbance sont réalisées sur le surnageant à 800 nm (signe de contamination), 620nm (absorption de la C-PC) et 652nm (absorption de l'APC). Cette méthode a été mise au point par Fermentalg.

Les concentrations en C-PC et APC sont calculées grâce aux formules suivantes définies par (Moon et al., 2014)

$[PC]\ (mg/ml) = (A_{620} - 0{,}474 * A_{652}) / 5{,}34$

$[APC]\ (mg/ml) = (A_{652} - 0{,}208 * A_{620}) / 5{,}09$

b) Protéines

(1) Analyse de la teneur en azote par la méthode du Kjeldahl automatisée

La biomasse est initialement centrifugée et lavée à l'eau ultra pure puis lyophilisée. Le culot cellulaire lyophilisé est introduit dans le minéralisateur automatique. Au cours de la minéralisation la matière organique est détruite par le chauffage dans l'acide sulfurique concentré (36N) pour former de l'ammonium. L'ajout de catalyseur permet d'accélérer la réaction. L'échantillon minéralisé subit ensuite une distillation où une alcalinisation de l'ammonium par la soude de manière à obtenir de l'ammoniaque. L'azote et la teneur en protéine sont alors déterminés par la titration du complexe formé par le borate (NF EN ISO 5983-2). La détermination du taux de protéine totale est conventionnellement obtenue en multipliant la teneur en azote total par le coefficient 6,25 en partant du constat que les protéines renferment 16% d'azote (Kjeldahl, 1883).

(2) Analyse des acides aminés

L'analyse de la teneur en acides aminés de la biomasse est réalisée à la suite d'une hydrolyse acide avec de l'acide chlorhydrique à 18,5% durant 24h à 110°C. Une neutralisation est ensuite réalisée par ajout de carbonate de calcium, les échantillons sont centrifugés, le surnageant filtré et dosé à l'HPLC sur gradient d'élution comme phase mobile (acétate pH 3,8 et acétonitrile) (NF EN ISI 13903), la méthode de détermination de la teneur en tryptophane suit la norme européenne (NF EN ISO 13904).

(3) Détermination de la digestibilité iléale in vitro des protéines brutes, Méthode Boisen

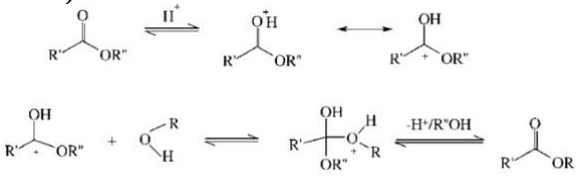
La quantification de la digestibilité des protéines est réalisée par la méthode Boisen une méthode de dosage enzymatique. Le principe consiste à provoquer des attaques enzymatiques à la pepsine, enzyme représentative de la digestion gastrique puis à la pancréatine, enzyme représentative de la phase intestinale. Après la digestion enzymatique, une filtration sur creuset de porosité C est réalisée puis le résidu est séché et la teneur en protéines brutes restante est dosée selon la méthode Kjeldahl présentée ci-dessus. Le ratio de protéines non digérées sur la teneur en protéines initiales indique le pourcentage de digestibilité des protéines (méthode adaptée du règlement CE 152/2009).

c) Sucres totaux

Les échantillons sont préalablement lyophilisés, 2 mg de biomasse sèche (MS) subit ensuite une hydrolyse acide avec 250 µl l'acide sulfurique 80% à 110°C pendant 1 min. La réaction est stoppée avec de l'eau glacée. Une gamme de glucose est préparée avec des concentrations en glucose allant de 6 g/L à 0,067 g/L. Le blanc constitué d'eau ultra pure, la gamme étalon et les échantillons hydrolysés sont colorés grâce à l'action d'une solution de phénol à 0,625 %. L'absorbance à 492 nm des échantillons est mesurée, la gamme étalon permet la création d'une droite d'étalonnage, ainsi l'absorbance à 492 nm multipliée au coefficient directeur de la droite d'étalonnage permet d'établir la concentration en sucres totaux présents dans l'échantillon (méthode interne Fermentalg adapté de la méthode de DuBois et al., 1956).

d) Acides gras

L'extraction des Acides Gras Méthyle Estérifiés (AGMEs ou Fatty Acid Methyl Esters : FAMEs) consiste à trans-estérifier à l'aide du Méthanol (transméthylation), en milieu acide (acide sulfurique) et à 80°C pendant 90 minutes, tous les acides gras présents dans le matériel biologique d'intérêt (1 g de MS).



(R' : radical variant selon le lipide, R'' = CH_3 avec le Méthanol)

Après la réaction de trans-estérification, les FAMEs sont extraits à l'Heptane, vortexés et centrifugés 5 minutes à 3000 rpm. La phase supérieure (Heptane + FAMEs) est récupérée puis les FAMEs sont séparés et analysés par Chromatographie en Phase Gazeuse (PR NF EN ISO 12966-1).

Les standards C17 :0 méthyl, C19 :0 méthyl, C21 :0 methyl et un blanc sont utilisés pour vérifier le bon état de la colonne et l'absence de perte de signal et des standards d'identification de PUFAs (acides gras polyinsaturés) (Supelco® 37 Component FAME Mix et PUFA No.3 Menhaden oil, Sigma-Aldrich) sont utilisés pour l'analyse du profil complet en acides gras.

3. Suivi de consommation

a) Dosage par HPLC (substrat et acides organiques)

Des échantillons de la culture cellulaire sont centrifugés et les surnageants sont filtrés sur un filtre de 0,2 µm et analysés en chromatographie liquide haute performance (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) avec une colonne H^+. Les composés analysés ont fait l'objet d'un étalonnage réalisé à partir de différentes solutions de concentrations connues.
Le chromatographe utilisé (SHIMADZU) a deux analyseurs : un détecteur infra-rouge et un détecteur ultra-violet. Le détecteur infra rouge est utilisé pour la détection du glucose, du glycérol et du lactose. Le détecteur à ultra-violet est utilisé pour la détection du lactate, du succinate et du citrate. La colonne Agilent Hi-plex H+ (7.7 X 300 mm) est utilisée et les données sont acquises et analysées par le logiciel LABSolutions. La température du four est fixée à 60°C et une solution d'acide sulfurique H_2SO_4 à 5 mM est utilisée comme éluant à un débit de 0,6 ml/min.

b) ICP-MS (analyse réalisée par l'INRA de Villenave d'Ornon)

La spectrométrie par torche à plasma (ICP-MS : Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) est une technique de quantification des éléments inorganiques présents dans un échantillon. Cette technique est utilisée pour la quantification des concentrations en ions de nos substrats complexes (NF EN ISO 11885).

c) Teneur en ammonium et phosphate

Les quantités d'ammonium (NH_4^+) et de phosphate (PO_4^{3-}) présentes dans un échantillon sont mesurées grâce à une méthode de réflectométrie mise au point par la société Merck (Reflectoquant®). Le principe consiste à insérer une bandelette durant deux secondes dans l'échantillon d'intérêt dilué si nécessaire pour être dans la gamme de concentration indiquée par le kit de mesure 20-180 mg/L pour NH_4^+ et 5-120 mg/L pour le $PO4^{3-}$.

d) Demande Chimique en Oxygène (DCO)

Un kit de dosage LCK 014 (Hach) permet de doser les substances oxydables réagissant avec le bichromate de potassium sulfurique en présence de sulfate d'argent. Le chlorure est masqué avec du sulfate de mercure. L'échantillon est ajouté dans une cuve de dosage contenant les réactifs, le mélange est homogénéisé et minéralisé par le thermostat haute température HT 200S (Hach) et son programme HSD (High-Speed-Digestion) de 15 minutes. La coloration verte du Cr^{3+} est ensuite déterminée par photométrie.

4. Analyse du produit fini

a) Analyse énergétique

Les valeurs énergétiques associées à la biomasse séchée de *G. sulphuraria* ont été déterminées par Eurofins analitycs selon la méthode normée (UE) N°1169/2011 du parlement européen et du conseil du 25 octobre 2011 concernant l'information des consommateurs sur les denrées alimentaires.

b) Activité antioxydante *in vitro*

L'activité antioxydante *in vitro* de la biomasse de *G. sulphuraria* a été déterminée par la méthode ORAC (Capacité d'Absorbance des Radicaux Libre) mesurant un activité Trolox équivalent (Cao et al., 1993) par le laboratoire Polyphénols Biotech (Villenave d'Ornon). C'est une analyse indicative ne permettant pas de conclure sur l'activité antioxydante du produit *in vivo*.

c) Analyse microbiologique

Les analyses microbiologiques du produit ont été réalisées par Phytocontrol Agrifood France détenant l'accréditation COFRAC N°1-6066 et certifié ISO 14001 :2015. Les méthodes utilisées pour la recherche et le dénombrement des microorganismes sont couverts par l'accrédiation1-6066. Les résultats microbiolgiques doivent être conformes au règlement (CE) N°2073/2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires (Tab. 6).

Tableau 6. Standards microbiologiques applicables aux produits alimentaires Règlement 2073/2005

Paramètres	Méthode	Spécifications
Microorganisme aérobie 30° C (CFU/g)	NF ISO 4833-1	10^5
Coliforme Thermo tolérant s (CFU/g)	NF V08-060	< 10
Sulfite reducing anaerobic bacteria (CFU/g)	NF V08-061	< 10
Clostridium perfringens (CFU/g)	NF EN ISO 7937	< 1
Staphylococci Coagulase positive (CFU/g)	BRD 07/09-02/05	< 100
Salmonella spp (Négative/25g)	BRD 07/11-12/05	Négative
Listeria monocytogènes (Negative/25g)	AES 10/03-09/00	Négative

d) Analyse en métaux lourds

Les analyses en métaux lourds du produit ont été réalisées par Eurofins par un dosage ICP-MS. Les résultats en métaux lourds doivent être conformes aux règlement (CE) N°629/2008 1006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les compléments alimentaires. Le critère pour l'Arsenic est fixé par le CEVA (Centre d'étude et de valorisation des algues) (Tab. 7).

Tableau 7. Standards en teneur maximales en métaux lourds dans les denrées alimentaires Règlement 1881/2006.

Galdieria sulphuraria	Méthode	Spécifications	Règlement
Plomb (mg/kg)	Interne ICP-MS	<3	629/2008
Cadmium (mg/kg)	Interne ICP-MS	<3	629/2008
Arsenic (mg/kg)	Interne ICP-MS	<3	Critère CEVA
Mercure (mg/kg)	Interne ICP-MS	<0,1	629/2008

E. Caractérisation des systèmes de transport de sucres de *G. sulphuraria*

1. Absorption de sucres radio-marqués par une suspension cellulaire de *G. sulphuraria*

Les cultures cellulaires sont cultivées sur des milieux du culture détenant du lactose ou du glycérol comme source de carbone organique. Les cellules sont centrifugées à 1000 g pendant 5 min puis rincées avec du milieu sans source de carbone. Les mesures d'absorption sont effectuées sur les cellules en phase exponentielle de croissance. Les suspensions sont placées en fioles Erlenmeyer dans un incubateur à 37°C en hétérotrophie sous agitation (140 rpm) et la masse sèche de chaque suspension est mesurée. Le milieu réactionnel est composé du milieu de culture sans carbone, du substrat froid et du substrat radioactif. Le lactose radioactif utilisé est du Lactose [D-glucose-U-^{14}C] à 250mCi/mmol (Moravek, USA), le glycérol [^{14}C(U)] à 150mCi/mmol (Moravek, USA), le D-glucose-U-^{14}C à 300mCi/mmol (ARC, USA) et le Galactose D-[1-^{3}H(N)] à 250mCi/mmol (ARC, USA). Chaque mesure d'absorption est réalisée sur 3 lots biologiques distincts.

Tableau 8. Exemple de la composition du mélange réactionnel pour les essais de cinétique

Transport	Lactose	Glycérol
Densité optique finale de la biomasse	2,5	2,5
Concentration de carbone froid (mM)	50	1
Concentration en carbone radioactif (∝Ci/ml)	0,6	0,6

.

Au temps T0, un volume de 100 µl de biomasse est ajouté à 100 µl de mélange réactionnel initialement inséré dans les tubes à hémolyse et placé à 37°C, l'ensemble est vortexé et les tubes sont insérés obliquement sur un portoir dans l'incubateur agitant (vitesse d'agitation) de manière à favoriser l'homogénéisation du mélange réactionnel. Chaque tube reste sous agitation durant le temps de l'incubation puis 4ml de milieu sans carbone à 4°C sont introduits dans le tube au temps voulu afin de stopper l'absorption de sucre. L'ensemble est déversé sur un filtre (Fisherbrand™ Filtres micro fibre de verre, grade 261) puis rincé une seconde fois avec 4ml de milieu sans carbone à 4°C. Le filtre retient les cellules qui sont digérées par incubation à 60 °C pendant 16 h dans 800 µl de milieu de digestion (acide perchlorique 13 % (v/v) ; hydrogène peroxyde 12 % (v/v) ; Triton X-100 0,04% (p/v)). Pour le comptage de la radioactivité, 8 ml de liquide à scintillation (EcoLite TM (MP)) sont ajoutés dans les tubes puis les tubes sont insérés dans un compteur à scintillation liquide (TRICARB 2910 TR, Packard instruments – PERKIN ELMER). La quantité de sucre absorbée est exprimée en nmol/mg$_{MS}$.

2. Détermination des paramètres cinétiques et de la spécificité des systèmes de transport de sucres

Les paramètres cinétiques (affinité K_m et vitesse maximale d'absorption V_{max}) des systèmes de transport ont été déterminés en mesurant l'absorption des sucres radiomarqués en fonction de différentes concentrations en sucres. Des analyses de compétition ont permis d'étudier la spécificité des systèmes de transport en mesurant l'absorption du substrat en présence d'autres substrats, la concentration du substrat de compétition étant 10 fois supérieure à celle du substrat radioactif (50 mM de lactose radiomarqué et 500 mM de sucres compétitifs).

L'identification du besoin énergétique des différents systèmes de transport est faite grâce à l'action du Carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCP) qui est un protonophore ou agent découplant qui perturbe le gradient de protons et réduit l'activité des co-transporteurs sucres /H^+. Le CCCP est ajouté au milieu d'incubation à une concentration de 10 µM. La solution de CCCP étant préparée dans l'éthanol, un contrôle avec éthanol et sans CCCP est ajouté à la condition contrôle sans éthanol et sans CCCP.

F. Étude différentielle de l'expression des gènes

1. Assemblage *de novo* du génome de *G. sulphuraria*

Le génome de la souche UTEX 2919 a été séquencé. L'ADN a été préalablement extrait et purifié avec le kit d'extraction NucleoSpin® Plant II de Macherey-Nagel puis séquencé par la société Genewize selon la configuration du séquençage Illumina HiSeq 2x150pb par ligne. L'assemblage *de novo* de ce génome a été effectué en utilisant le programme développé par l'université académique de Saint-Petersburg Spades (version galaxy 3.12.0) en utilisant les k-mers : 21, 33, 55, 65, 75 (Bankevich et al., 2012). La prédiction structurelle des gènes a été faite avec le programme Augustus entraîné à la prédiction de gènes de 50 organismes dont *Galdieria sulphuraria* (version galaxy 3.2.3 ; Stanke et Waack 2003) et l'identification fonctionnelle de ces gènes a été réalisée grâce à des blasts sur la base de donnée NR par BLAST2GO (version 5.2.5) et sur les séquences codantes connues de *G. sulphuraria* et *Cyaniodioschyzon* par le programme NCBI Blast + (version galaxy 0.2.01 ; Cock et al. 2013).
L'alignement des séquences d'ADN génomique est réalisé avec l'outil BWA-MEM (version galaxy 0.7.17.1 ; Li et Durbin 2009).

2. Étude comparative

a) Souches utilisées

L'expression des gènes de la souche UTEX 2919 est étudiée ainsi que ceux de la souche variante FCC 3432 capable de produire de la C-PC à l'obscurité.

b) Conditions de culture

La souche UTEX 2919 est cultivée sur un milieu contenant du PDL comme source de carbone organique en mixotrophie et hétérotrophie. Cette même souche UTEX 2919 est également cultivée sur glycérol en hétérotrophie. La souche variante FCC 3432 est mise en culture sur le milieu PDL en hétérotrophie. Ces conditions permettent de distinguer un effet lumière, un effet substrat et un effet souche (Fig. 17).
Les cultures sont stabilisées en mode Chémostat, avec un débit d'alimentation constant aboutissant à un taux de croissance de 0,01 h^{-1} pour une masse sèche stable aux alentours de 100 g/L. Le pH est régulé à 3 par addition d'une solution concentrée d'ammoniaque (14%) ou d'acide sulfurique (4N), la température est régulée à 37°C, l'agitation stable à 1500 rpm et l'air à 1 ml/min.

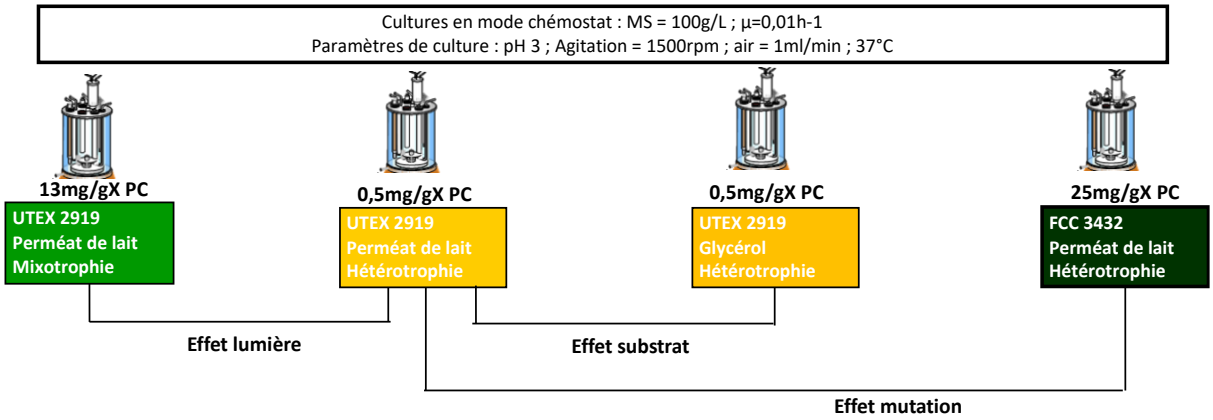


Figure 17. Schéma du plan d'expérience de l'étude différentielle d'expression des gènes

3. Extraction des ARNs

La biomasse est extraite des 4 conditions de culture en régime permanent, trois prélèvements sont réalisés par condition à 24 h d'intervalle. Les ARNs de chaque condition sont extraits grâce à l'utilisation du kit NucleoSpin® RNA Plant (Macherey-Nagel, Allemagne).

Contrôle qualité :

Une migration sur gel d'agarose à 0,8 % avec un tampon TAE à 0,5X est réalisée pour l'ensemble des échantillons d'ARNs extraits : 12 échantillons et un marqueur ADN. Le gel est ensuite observé sous lumière UV. Deux bandes d'ARN ribosomaux doivent être observées, une bande à 1,9 kb représentant la sous unité 18S et une bande à 5 Kb représentant le 28S.

Contrôle quantité :

La concentration en ARNs de chaque échantillon est mesurée au spectrophotomètre NanoVue™ Plus (VWR), ou par mesure de l'absorbance à 260 nm (une DO 260 nm de 0,1 correspond à 4 µg/ml d'ARNs). Le rapport DO260nm/DO280nm renseigne sur la pureté de l'échantillon, celui-ci doit être proche de 2. Les échantillons ont été analysés au « bioanalyzer RNA » grâce à des puces 6000 PICO sur la plateforme Génome-Transcriptome de Bordeaux (fonds du Conseil Régional s'Aquitaine n°20030304002FA, de l'Union Européenne FEDER n°2003227 et des Investissements d'Avenir ANR-10-EQPX-16-01). Ce dosage au bioanalyzer renseigne sur la concentration en ARN totaux, ratio 28S/18S et le RIN (RNA Integrity Number) (Tardu et al., 2016). Pour être séquencé les prérequis des échantillons sont une quantité d'ARNs ≥ 2µg, RIN ≥ 6.0 ; concentration ≥ 50ng/µl et une pureté A260/A280 = 1.8-2.2.

4. Séquençage

Le séquençage a été réalisé par la société Genewize (États-Unis), les librairies d'ARNs sont préparées avec une sélection polyA, la mode de séquençage est Illumina HiSeq 2x150pb. Les résultats sont rendus sous format fastq avec une librairie vers l'avant (*forward*) et une librairie vers l'arrière (*reverse*) pour chaque condition.

5. Analyse bio-informatique

La qualité du séquençage est préalablement évaluée en regardant le contenu GC, la présence d'adaptateurs et le contenu en k-mer (segment de lecture) et séquences surexprimées ou dupliquées. Le contrôle qualité de l'ensemble des lectures est réalisé par l'outil FastQC (v0.72). Les séquences d'ARNs de *G. sulphuraria* sont nettoyées grâce au programme Trimmomatic (v0.36.6) (Bolger et al., 2014) permettant de couper les adaptateurs de séquençage (ILLUMINACLIP) et les régions de mauvaise qualité de séquençage (SLIDINGWINDOW). Les séquences nettoyées sont ensuite alignées sur le génome de référence assemblé de notre souche en utilisant le programme HISAT2 (version galaxy 2.1.0) (Kim et al., 2015). Le résultat de « mapping » sous format BAM est utilisé par le programme Cuffdiff (Galaxy version 2.2.1.5) (Trapnell et al., 2010), cet outil permet d'identifier les différences d'expression des transcrits, d'épissage et de promoteur. Pour calculer la p-*value* Cuffdiff trie les séquences et compte combien d'entre elles sont différentes de la valeur log2 (fold-change), ce nombre est divisé par le nombre total de séquences comparées. Une différence entre deux conditions est jugée significative lorsque la p-value est inférieure à 0,05.

IV. RESULTATS

IV. Résultats

Les résultats sont présentés en quatre parties distinctes, chacune d'elles a pour objectif d'apporter des éléments de réponse sur les performances et l'intérêt industriel de la souche *Galdieria sulphuraria*. Sa capacité de croissance sur différents substrats et conditions de culture, sa méthode et vitesse d'absorption des sucres, sa faculté à produire des molécules d'intérêts et la variation de l'expression de ses gènes en fonction de son environnement sont évalués. La synthèse et la compréhension de ces données doivent permettre la mise en place d'un procédé de production robuste, à vocation industrielle et aboutissant à la fabrication d'un produit à haute valeur ajoutée.

Partie A : Recherche et Développement du procédé de production

La première partie de ce travail est consacrée à la sélection de la souche micro-algale et à la création de l'environnement de culture en y intégrant des coproduits laitiers. La mise au point des conditions de culture, l'optimisation du procédé de production en bioréacteur et la montée en échelle en bioréacteur de type industriel y sont ensuite détaillées.

Partie B : Caractérisation du transport cellulaire

Cette seconde partie consiste à mesurer l'absorption au niveau de la membrane plasmique de plusieurs substrats carbonés à l'échelle cellulaire. La caractérisation du système de transport du lactose, glycérol, glucose et galactose est effectuée afin d'apporter des connaissances sur les caractéristiques d'absorption de ces sucres chez *Galdieria sulphuraria*. La compréhension des mécanismes d'absorption du lactose a pour objectif d'adapter le procédé de production utilisant les coproduits laitiers et les stratégies de pilotages.

Partie C : Étude différentielle de l'expression des gènes

L'intérêt de réaliser une étude comparative de l'expression des gènes en fonction de quatre conditions de culture différentes est d'identifier les gènes liés au transport du lactose et du glycérol dans la cellule ainsi que ceux impliqués dans la voie métabolique de la C-PC. Cette partie du projet de recherche a pour vocation d'apporter des éléments de réponse sur la compréhension des mécanismes intracellulaires de la souche d'intérêt.

Partie D : Potentiel nutritionnel du produit et caractère dépolluant du procédé

Cette dernière partie présente les caractéristiques nutritionnelles de la biomasse microalgale, la qualité sanitaire du produit et la capacité dépolluante du procédé de production.

IV. Résultats

A. Recherche et Développement du procédé de production

La mise en œuvre d'un procédé de production commence par la recherche à l'échelle laboratoire avant d'être poursuivie par le développement à l'échelle pilote puis industrielle. Un certain nombre de paramètres doivent être validés avant de passer d'une étape à l'autre et d'une échelle à une autre.

La première étape de ce processus a été de sélectionner un microorganisme ayant un intérêt industriel, les critères recherchés au cours de ce travail étaient la capacité des souches microalgale à produire une quantité importante de protéines et de C-PC tout en consommant le lactose présent dans les coproduits de l'industrie laitière. Les souches de la classe des *Cyanidiophyceae* ont été retenues pour leur aptitude à consommer un grand nombre de sources organiques carbonées et pour leur composition cellulaire intéressante (Gross and Schnarrenberger, 1995; Oesterhelt et al., 1999), notamment pour leur contenu en protéines et en pigments bleus (C-PC et APC).

La deuxième étape consistait à cribler les souches capables de cataboliser différents substrats organiques notamment le lactose afin de le convertir en biomasse et en produit d'intérêt selon différents modes trophiques (hétérotrophie ou mixotrophie).

Suite à l'identification de l'espèce microalgale retenue, une caractérisation de sa croissance selon les modes trophiques a été opérée avec la détermination des taux de croissance spécifiques et l'analyse des molécules d'intérêt produites. Le milieu de culture a ensuite été élaboré en adaptant des données bibliographiques et en réalisant de nombreux essais en fioles Erlenmeyer avec différentes compositions de milieux.

La mise au point du procédé de production s'est poursuivie en bioréacteur de laboratoire afin d'évaluer les performances pouvant être atteintes dans un environnement contrôlé, avec les problématiques liées à une culture en bioréacteur (environnement sous pression, contrainte de cisaillement et d'hétérogénéité éventuelle) et selon différents modes de culture (Batch, Fed-Batch et Chémostat).

Suite à l'optimisation du procédé de production, une montée en échelle en bioréacteur de type industriel a été opérée, le transfert de procédé du laboratoire vers l'unité pilote a impliqué une augmentation de volume et une adaptation aux problématiques industrielles (stérilisation en place, pilotage avec régulation de la pression).

1. Sélection, criblage et caractérisation de la souche

a) Sélection d'une souche d'intérêt

Les souches de la classe des *Cyanidiophycea* sont décrites dans la littérature comme ayant la capacité de produire de la C-PC. Un criblage sur lactose de différentes espèces de cette classe a été effectué afin de choisir le représentant modèle de ce procédé de production.

Un comparatif de croissance de trois souches de *Cyaniodiophycea* (UTEX2919, FCC1789 *G. sulphuraria* et FCC2701 *Cyanidioschyzon*) a été réalisé. Ce sont des souches libres d'exploitation industrielle issues de banques publiques et maintenues dans la collection Fermentalg. Les trois souches ont été cultivées en fioles Erlenmeyer sur le milieu de culture adapté d'Allen 1959 avec du PDL apportant du lactose comme principale source de carbone organique (Partie II-B-2 Tab. 5), dans un même incubateur à la lumière (60 µmole/m^2/s) à 37°C et avec une agitation de 140 rpm.

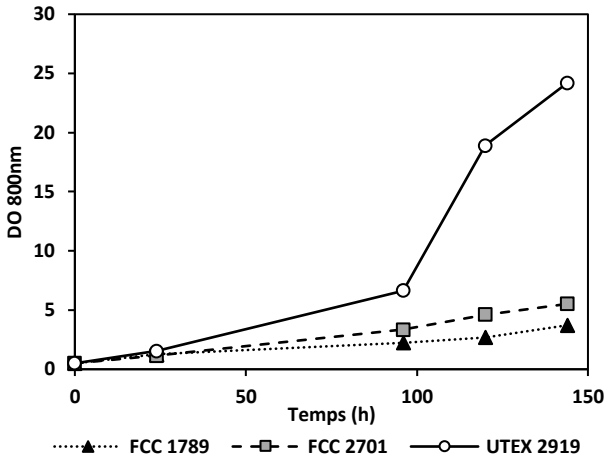


Figure 18. Suivi de croissance de trois souches de Cyanidiophycea (FCC1789, FCC2701 et UTEX2919). Milieu de culture contenant du perméat de lait.

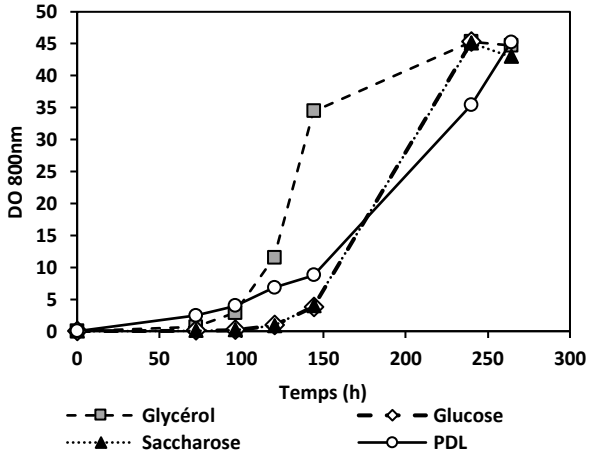
Cet essai comparatif des croissances des souches de *Cyanidiophyceae* a permis d'identifier la souche UTEX2919 comme ayant une meilleure croissance que les souches FCC1789 et FCC2701 sur un milieu contenant du PDL. Au bout de 144h de culture la souche UTEX2919 atteint une DO de 24,2 alors que la DO de la souche FCC2701 n'est que de 5,52 et celle de la souche FCC1789 est de 3,72 (Fig. 18).
La souche *G. sulphuraria* UTEX 2919 a donc été sélectionnée pour le développement du procédé de production.

b) Criblage de substrats carbonés organiques et composition intracellulaire

(1) Évaluation de substrats sur la croissance de la souche

L'évaluation du potentiel métabolique de la souche sur différents substrats a été opéré afin d'évaluer la capacité de croissance et la composition intracellulaire de la souche UTEX2919 en fonction de la source de carbone organique présente dans le milieu de culture. Les substrats carbonés couramment utilisés pour la culture des microalgues sont le glucose, le saccharose et le glycérol pour des raisons de coût et de facilité d'approvisionnement.

(A)



(B)

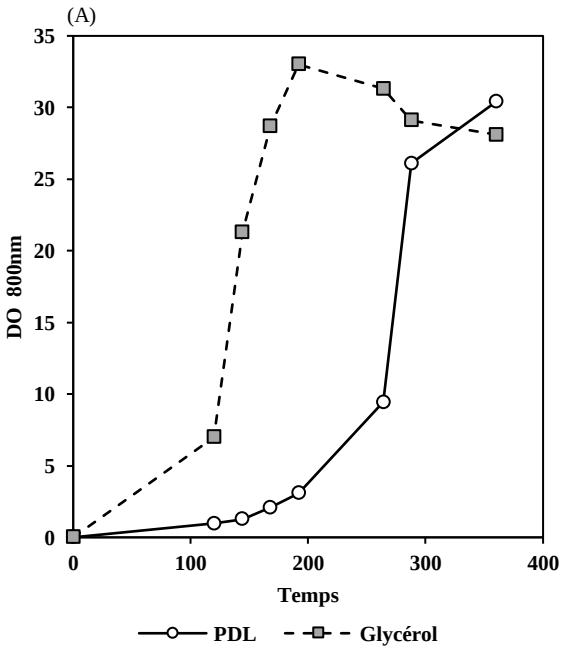
264h	Glycérol	Glucose	Saccharose	PDL
DO	45	45	43	45,2
C-PC (mg/gMS)	45,72	4,74	7,43	2,02

Figure 19. Criblage substrats de la souche UTEX2919. A) Suivi de croissance sur le milieu type composé de différentes sources de carbone organique. B) C-PC intracellulaire en fin de culture

IV. Résultats

Ce criblage de substrats a confirmé la capacité d'utilisation de l'ensemble des substrats testés par la souche UTEX2919. La pré-culture utilisée pour l'ensemencement des différents milieux contenant du glycérol, du glucose ou du saccharose avait été préalablement cultivée sur un milieu glycérol ce qui peut expliquer la croissance plus rapide sur le milieu glycérol. En effet, un changement de substrat d'une culture a une autre peut avoir un impact sur la durée de la phase de latence correspondant à une adaptation du métabolisme carboné à la nouvelle source de carbone. La pré-culture utilisée pour ensemencer le milieu PDL avait été cultivée sur un milieu contenant déjà du PDL afin d'habituer la souche à ce substrat complexe. Nous pouvons observer que la production de C-PC est plus importante lors d'une culture sur glycérol, 6 à 9 fois plus élevée que sur les milieux saccharose ou glucose respectivement et 23 fois plus importante que sur le milieu PDL où la production de C-PC n'est que de 2 mg/g_{MS} de C-PC (Fig.19).

Une autre culture en mixotrophie sur un milieu glycérol et sur un milieu sur PDL a été réalisée afin de caractériser la croissance et la teneur protéique intracellulaire de la souche UTEX2919 (Fig. 20).



(B)

360h	PDL	Glycérol
PC (mg/gMS)	0,88	76,63
Ecart type	0,12	0,99
Azote total (%MS)	8,04	8,62
Ecart type	0,08	0,09
Protéines (%MS)	50,25	53,875

Figure 20. Comparaison de la croissance et de la composition cellulaire de la souche UTEX 2919 cultivée en mixotrophie sur un milieu contenant du glycérol ou du PDL. A) Suivi de croissance B) Teneur intracellulaire en C-PC et en protéines.

Les pré-cultures utilisées pour ce suivi de croissance ont été réalisées sur les substrats adaptés, sur un milieu PDL pour la culture sur PDL et sur un milieu glycérol pour la culture sur glycérol. Les paramètres de culture sont identiques pour les deux fioles Erlenmeyers. Les souches sont cultivées dans le même incubateur en présence de lumière apportée par des néons à une intensité de 60 µmol/m^2/s, la température est contrôlée à 37°C, l'agitation était de 140 rpm et le pH initial des deux milieux de culture est égal à 3. Les milieux de culture sont assemblés selon la même méthode, la seule différence se trouve au niveau de la source de carbone organique.
La comparaison de croissance de la souche UTEX2919 sur ces deux substrats confirme la présence d'une plus longue phase de latence sur le milieu contenant du PDL. Le taux de croissance moyen de la souche est de 0,022h^{-1} lors de la phase exponentielle pour les deux types de substrat carboné (Fig. 20A). L'analyse de la biomasse est déterminée par la méthode Kjeldahl (N*6,25) révèle une teneur protéique similaire que les cellules aient été cultivées sur un milieu PDL ou un milieu glycérol, 50,25% et 53,9% respectivement (Fig. 20B). A contrario,

la différence de production de C-PC entre ces deux substrats organiques se confirme. La souche cultivée en mixotrophie sur glycérol produit 76,63 mg/g_{MS} de C-PC avec une biomasse de couleur bleu-vert alors que celle cultivée en présence de PDL produit 0,88 mg/g_{MS} de C-PC et la couleur de la biomasse est jaune (Fig. 21B).

(2) Effet des composés du Perméat de lait sur la croissance cellulaire et la pigmentation

Le PDL est un substrat complexe composé à 83% (g/g) de lactose et détient également d'autres éléments susceptibles d'influencer la pigmentation des cellules de *G. sulphuraria* comme le phosphore, le calcium, les acides organiques ou les protéines résiduelles.

Pour déterminer l'effet des composants du PDL autre que le lactose sur la croissance de la souche UTEX2919, un comparatif de croissance de la souche UTEX2919 sur un milieu contenant du PDL ou du lactose pur a été mis en œuvre.

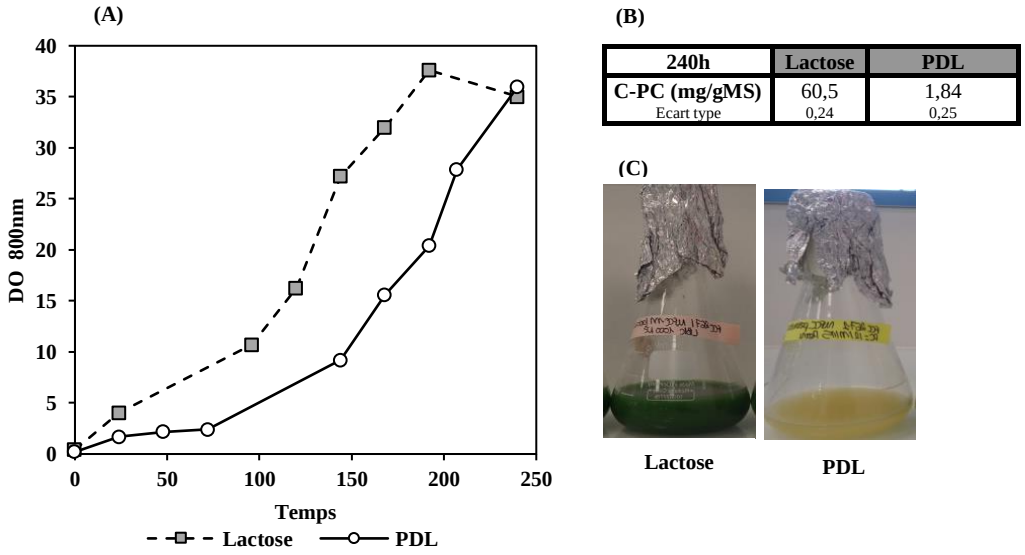


Figure 21. Comparatif de culture de la souche UTEX2919 sur un milieu contenant du lactose ou du PDL. A) Suivi de la densité cellulaire, B) Dosage de la C-PC, C) Photographie des erlenmeyers en fin de culture.

La souche UTEX2919 cultivée sur le milieu contenant du lactose pur ou du PDL a le même taux de croissance maximal (μmoyen = 0,015h^{-1}). Toutefois, la phase de latence est plus longue lors d'une culture sur un milieu PDL et la production de C-PC est considérablement réduite avec une valeur de 1,84 mg/g_{MS} contre 60,5mg/g_{MS} de C-PC sur lactose pur. Cet essai a mis en lumière qu'un ou plusieurs composés du PDL autre que le lactose pourrait avoir un effet inhibiteur sur la phase initiale de croissance et la synthèse de C-PC (Fig. 21).

2. Effet de la lumière sur la croissance et la composition cellulaire

L'espèce *G. sulphuraria* est connue comme étant un microorganisme mixotrophe (Graverholt et Eriksen 2007; Gross et Schnarrenberger 1995; Schwerna, 2015; Sloth, Wiebe, et Eriksen 2006). Les performances de croissance et l'impact que peut avoir la présence ou l'absence de lumière sur la composition intracellulaire de la souche ont été déterminées lors d'une étude comparative de la croissance de la souche UTEX2919 en hétérotrophie et mixotrophie en incubateur à la lumière (intensité lumineuse de 60μmol/m^2/s).

IV. Résultats

a) Suivi de croissance de la souche UTEX2919 en fonction du mode trophique sur un milieu PDL (Erlenmeyers)

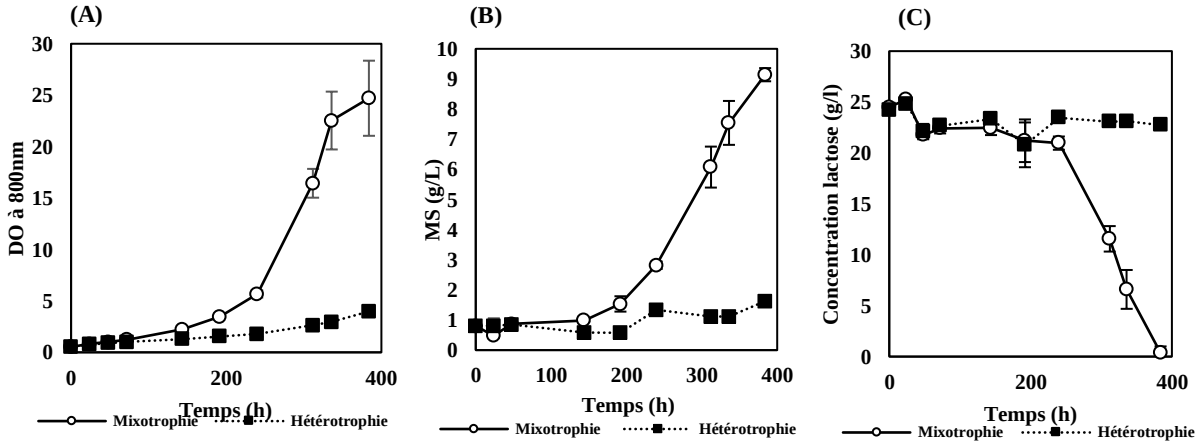


Figure 22. Caractérisation de la souche UTEX2919. A) Suivi de l'absorbance à 800nm, B) Suivi de la concentration de la biomasse en masse sèche, C) Suivi de la consommation en lactose, en mixotrophie et hétérotrophie.

La même pré-culture de la souche UTEX2919 cultivée en mixotrophie a été utilisée pour inoculer 6 fioles Erlenmeyers (3 en mixotrophie, 3 en hétérotrophie). En hétérotrophie, la densité cellulaire de la biomasse est passé d'une DO initiale de 1,5 à une DO de 5 en fin de culture. La concentration en lactose dans le milieu est restée relativement stable aux alentours de la concentration initiale à 23 g/L (Fig. 22C). Pendant ces 384h d'incubation dans le milieu PDL en hétérotrophie la souche ne s'est pas multipliée significativement (Fig. 22B) et n'a pas consommé le substrat présent dans le milieu (Fig. 22C). En mixotrophie, une longue phase de latence de 200h a été observée, l'allongement de ce temps d'adaptation peut être la conséquence d'une pré-culture effectuée sur glycérol et non pas sur PDL comme dans les essais précédents. Lors de la phase de croissance exponentielle le μ_{moyen} est de 0,015h^{-1} avec un rendement en biomasse produite par g de lactose consommé r_{MSL} de 0,37 g_{MS}/g_L. Ces résultats traduisent un effet positif de la lumière sur le métabolisme de la *G. sulphuraria* UTEX2919 sur un milieu contenant du PDL.

Les fioles Erlenmeyers de l'incubateur en hétérotrophie ont été laissés 100h de plus en culture afin de discerner si la souche cultivée en hétérotrophie avait une plus longue phase de latence ou bien si elle ne pouvait réellement pas se développer sans lumière sur ce milieu. Au bout de 484h de culture la souche UTEX2919 cultivée en hétérotrophie a atteint 2,35 g/L de MS ce qui peut refléter une très faible croissance ou être simplement la conséquence d'une concentration de la MS par évaporation de l'eau. La concentration en lactose ayant légèrement diminuée nous pouvons envisager l'hypothèse d'une légère croissance. La pré-culture ayant été cultivée en présence de lumière le temps d'acclimatation des cellules à un environnement à l'obscurité (condition en hétérotrophie) peut être plus long.

b) Composition cellulaire en protéines et phycocyanine de la souche UTEX2919

Une étude analytique du contenu intracellulaire en protéine a été réalisée sur la biomasse produite (Fig. 22) sur des échantillons prélevés après 384h de culture pour la souche en mixotrophie et après 484h de culture pour la souche en hétérotrophie. La souche UTEX2919 est jaune et la teneur en C-PC est nulle sur le milieu de culture contenant du PDL dans les deux conditions de culture, c'est ainsi que les analyses se sont focalisées sur la teneur protéique de la biomasse microalgale.

Tableau 9. Teneur intracellulaire en protéines en fonction du mode trophique de culture

	Mixotrophie	Hétérotrophie
Azote total (%MS)	8,22	9,09
Ecart type	0,12	0,06
Protéines (%MS)	51,35	56,79
Ecart type	0,75	0,34

La teneur en protéines intracellulaires est légèrement supérieure en hétérotrophie avec 56,79% de la MS et 51,35% de la MS pour la biomasse cultivée à la lumière (Tab. 9).

c) Adaptation à l'obscurité de la souche UTEX2919

Au fur et mesure des repiquages successifs de la souche UTEX2919 sur le milieu PDL en fioles Erlenmeyer en mixotrophie et hétérotrophie celle-ci a fini par s'adapter à l'obscurité en ayant une croissance similaire dans les deux conditions ($\mu_{moyen} = 0{,}025 h^{-1}$), elle est également devenue capable de produire de la C-PC, en mixotrophie uniquement ($13 mg/g_{MS}$) (Fig.23).

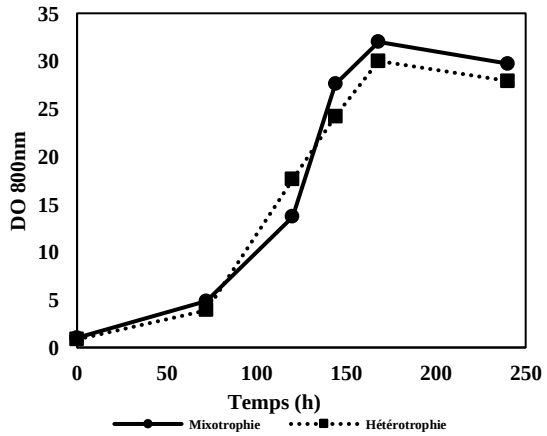


Figure 23. Suivi de croissance de la souche UTEX2919 après une adaptation au PDL par repiquage

3. Optimisation du milieu de culture

L'optimisation d'un procédé de production a pour objectif d'améliorer les performances techniques et les coûts de production. Plusieurs champs d'action peuvent être testés de manière à réduire les dépenses énergétiques, minimiser le temps de production, obtenir une meilleure qualité et une plus grande quantité de produit fini.

a) Effet de la concentration en substrat

Nous avons vu précédemment que certaines molécules présentes dans le PDL pouvaient influencer la croissance et la pigmentation de la souche (Fig. 21). Afin d'observer l'effet de la concentration en PDL sur la croissance de la souche UTEX2919, plusieurs milieux de culture ont été élaborés avec différentes concentrations en PDL (Fig. 24).

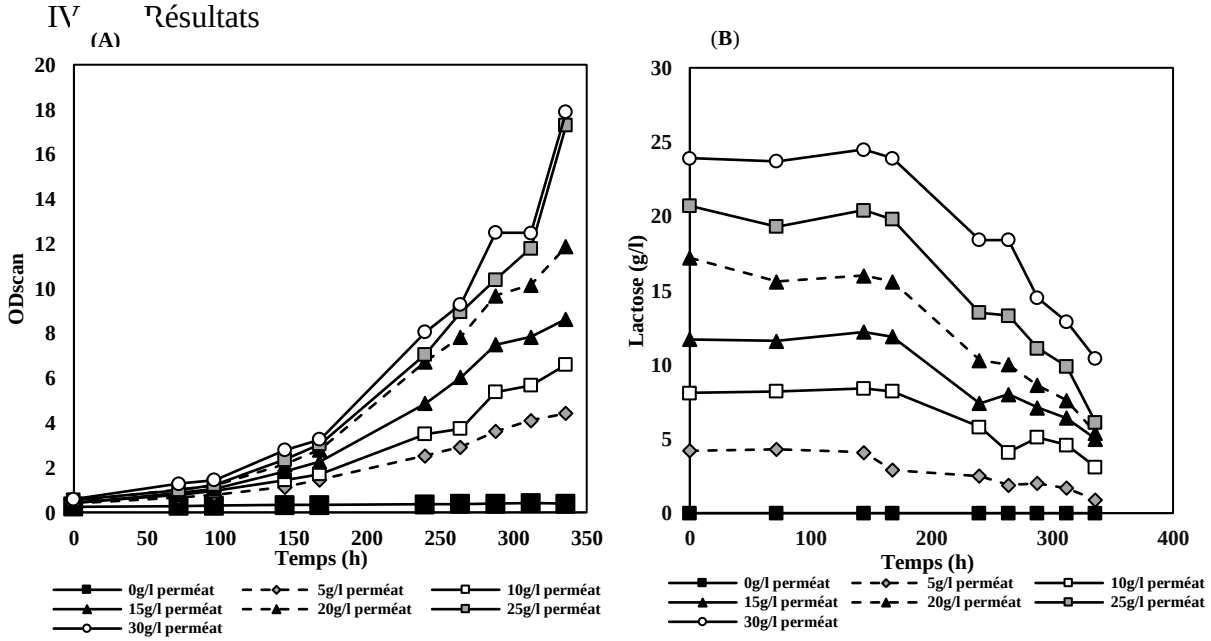


Figure 24. Suivi de la croissance de la souche UTEX2919 en fonction de la concentration initiale en perméat de lait dans le milieu de culture. A) Suivi de la densité optique via un ODscan B) Suivi de la consommation de lactose.

Les taux de croissance maximal correspondant aux cultures avec 0 g/L, 5 g/L, 10 g/L, 15 g/L, 20 g/L, 25 g/L et 30 g/L de PDL sont respectivement 0,002 h^{-1}, 0,010 h^{-1}, 0,012 h^{-1}, 0,012 h^{-1}, 0,015 h^{-1}, 0,015 h^{-1}. Lors de cet essai la souche UTEX2919 a eu un taux de croissance particulièrement faible pour l'ensemble des concentrations mais la condition avec 30 g/L de PDL, ce qui correspond à 25 g/L de lactose, est la condition permettant d'avoir le μmoyen le plus élevé.

b) Détermination du pH optimal de croissance

Pour optimiser la croissance il est essentiel de déterminer les meilleures conditions de pH. Dans la littérature il est stipulé que l'espèce *G. sulphuraria* croît à des pH allant de 1,5 à 4,5 (Doemel and Brock, 1971; Graziani et al., 2013). Dans le cadre de l'optimisation du procédé de production, les pHs du milieu de culture inférieurs à 3 n'ont pas été testés car les milieux à pH très acide augmentent la corrosion des bioréacteurs ce qui aboutit à une détérioration précoce du matériel industriel et diminue la durée de vie des équipements. Malgré cette volonté de ne pas travailler avec des pHs inférieur à 3, nous avons constaté que pour l'ensemble des conditions de culture en fioles Erlenmeyer le pH en fin de culture est situé entre pH 1,5 et 2.

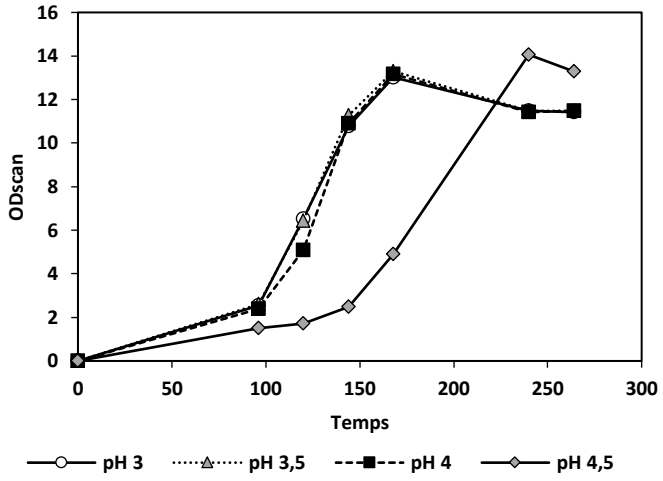


Figure 25. Suivi de la croissance de la souche UTEX2919 en fonction du pH sur le milieu type PDL en mixotrophie.

IV. Résultats

Le taux de croissance moyen de la souche est identique à pH 3, 3,5 et 4 avec un μ_{moyen} de 0,03 h^{-1} et seulement de 0,017 h^{-1} pour le pH 4,5. Le pH optimal de croissance pour la souche UTEX2919 sur PDL est inférieur à 4 (Fig. 25). La souche cultivée à pH 4,5 a un temps de latence de 150 h alors que celle-ci est de 100 h pour les pH 3, 3,5 et 4. La suite du développement du procédé a été réalisée sur un milieu de culture à pH 3, c'est un des pHs favorables à la croissance et une telle acidité réduit les risques de contamination externe.

c) Température

La mise au point du procédé de production a été réalisée à 37°C car des essais réalisés sur un milieu glucose et glycérol avait déterminé que cette température était la plus favorable à la croissance des souches de l'espèce *G. sulphuraria*. A cause de contraintes matérielles nous avons réalisé cette optimisation uniquement une fois le procédé passé en bioréacteurs (Annexe 1).

d) Effet de la lumière sur la production de C-PC

L'adaptation de la souche UTEX2919 sur PDL a permis de constater que l'apport lumineux n'avait plus d'effet sur la croissance de la souche (similaire en hétérotrophie et mixotrophie) mais qu'il favorisait la production de C-PC sur milieu PDL (Fig. 23). Une optimisation du type de lumière ainsi que de l'intensité lumineuse a donc été mise en œuvre. A ce stade du projet, ceci avait un intérêt essentiel pour la montée en échelle en bioréacteur car l'intensité et le type de lumière peuvent être ajustés dans le système d'éclairement par contre-pâle (Partie III-C-2-b).

A une échelle industrielle l'apport de lumière dans un procédé de production génère une dépense énergétique supplémentaire et donc un coût de production supérieur par rapport à une culture classique en hétérotrophie. Il est donc nécessaire d'étudier si les conditions optimales d'éclairement permettent un gain substantiel de productivité ou non avant d'être déployé à l'échelle pilote ou industrielle. Le suivi de l'absorbance à 800 nm a été réalisé sur des cellules cultivées en fioles Erlenmeyer en incubateur thermostaté à 37°C, avec une agitation à 140 rpm via une agitation magnétique, avec différentes intensités de lumière blanche ou lumière bleue. La lumière est apportée par des diodes électroluminescentes (LED) insérées dans les plaques d'agitation et illuminant le fioles Erlenmeyers par le bas.

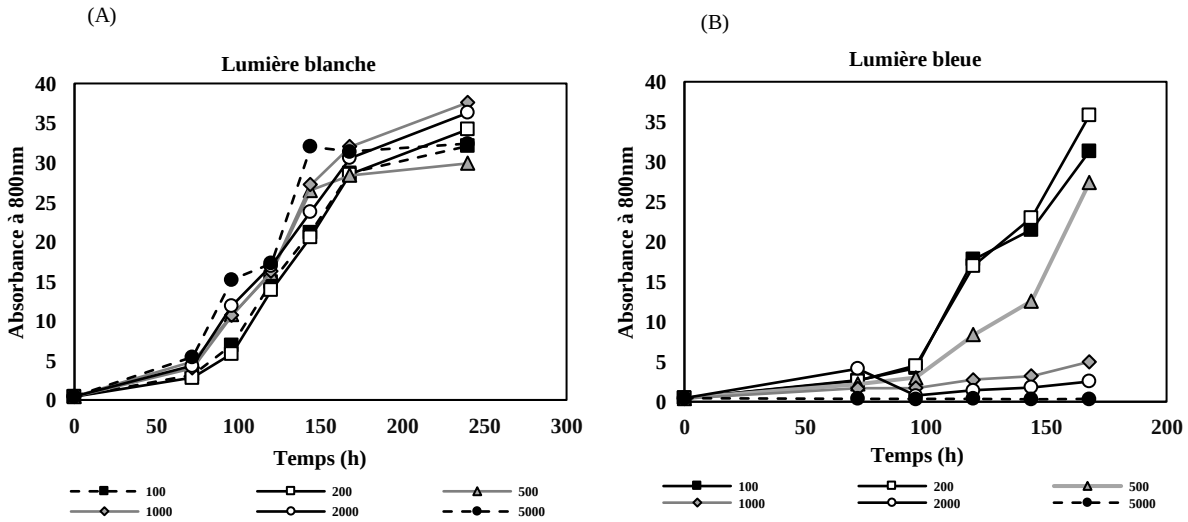


Figure 26. Suivi de croissance de la souche UTEX2919 adaptée au milieu PDL en lumière blanche ou lumière bleue avec des intensités lumineuses différentes (100-5000 µmol/$m^{-2}.s^{-1}$) .

IV. Résultats

Nous pouvons observer (Fig. 26A) que la souche UTEX2919 a une croissance similaire en lumière blanche quel que soit l'intensité lumineuse utilisée (100 à 5000 µmol/m^2/s). En revanche, en lumière bleue la souche a eu une phase de latence plus longue de 24 h qu'en lumière blanche (Fig. 26B). L'intensité de lumière bleue a provoqué une photoinhibition de croissance pour les intensités comprises entre 1000 et 5000 µmol/m^2/s. La souche cultivée avec des intensités de lumière bleue comprises entre 100 et 500 µmol/m^2/s a atteint une MS entre 11 g/L et 14 g/L et a consommé l'intégralité du lactose présent dans le milieu. La souche cultivée à 500 µmol/m^2/s a un taux de croissance plus faible en début de culture que dans les conditions 100 et 200 µmol/m^2/s en lumière bleue mais finit par atteindre un μ_{moyen} de 0,03 h^{-1}.

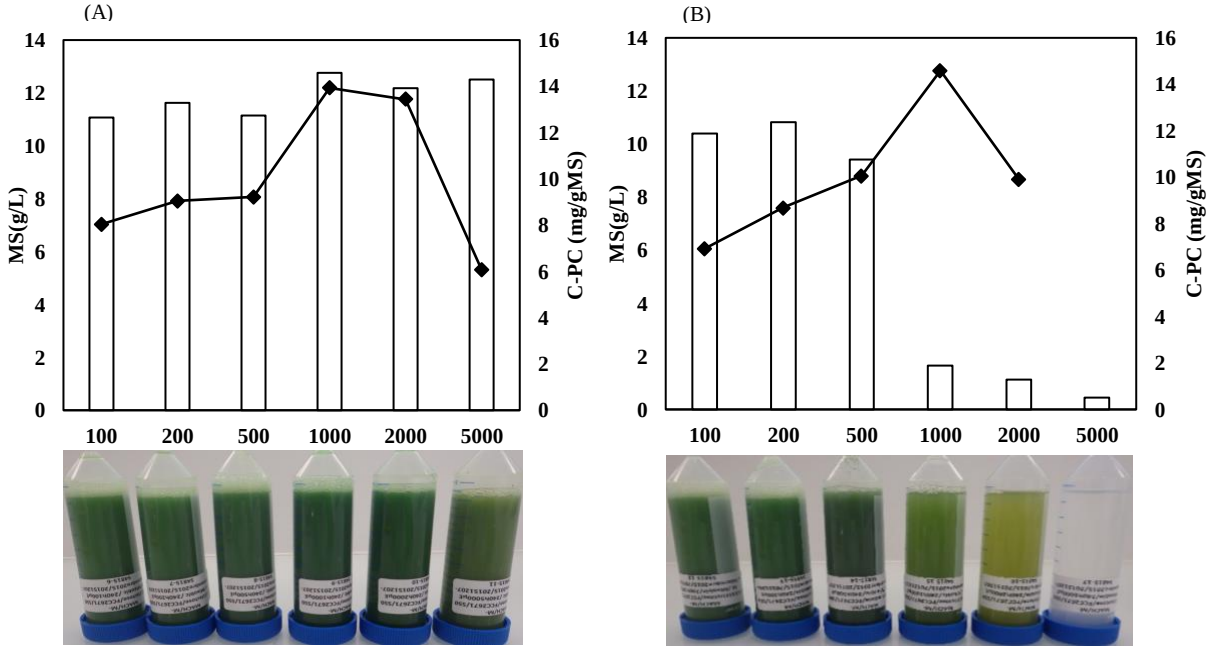


Figure 27. Suivi de croissance et de la production en C-PC de la souche UTEX2919 en présence de A) lumière blanche et B) lumière bleue à différentes intensités (100-5000 µmol/m^2/s). L'histogramme en blanc représente les concentrations de MS et la C-PC (mg/g$_{MS}$) est représentée par les losanges noirs.

Pour la lumière blanche, une intensité lumineuse comprise entre 1000 et 2000 µmol/m^2/s favorise la production de C-PC intracellulaire 13-14 mg/g$_{MS}$. De plus faibles intensités (100 et 500 µmol/m^2/s) provoque la diminution de la C-PC intracellulaire à 9 mg/g$_{MS}$ de C-PC et une diminution est également observée pour de plus fortes intensités comme celle à 5000 µmol/m^2/s (6mg/g$_{MS}$) (Fig. 27A). En lumière bleue, la condition permettant d'obtenir la plus forte teneur spécifique en C-PC a été celle de 1000 µmol/m^{-2}/s avec une valeur de 14,59 mg/g$_{MS}$ de C-PC mais la MS finale atteinte dans cette condition est très faible (1,65 g/L). Les conditions qui permettent un développement cellulaire correct sont les intensités lumineuses bleues comprises entre 100-500 µmol/m^2/s et permettent d'atteindre des concentrations en C-PC de 6 à 9 mg/g$_{MS}$.

La lumière blanche permet une croissance efficace qu'elle que soit l'intensité lumineuse utilisée et permet d'atteindre les plus fortes concentrations de C-PC intracellulaire, le reste du développement de procédé de production en bioréacteur s'est déroulé en présence de lumière blanche pour les conditions en mixotrophie.

e) Réduction des macro et microéléments ajoutés

Une étude ICP-MS a été réalisée afin d'identifier les macro et microéléments présents initialement dans le PDL et d'ajuster la préparation de nos milieux. L'objectif étant d'apporter les quantités en éléments nutritifs nécessaires à une croissance efficace sans être en excès afin d'optimiser la croissance et de réaliser des économies sur les coûts de production à l'échelle industrielle.

Tableau 10. Analyse ICP du perméat de lait dilué à 30 g/L dans de l'eau adoucie

	Milieu de chimiquement défini (calcul théorique)	**PDL concentré à 30 g/L (Résultats ICP-MS)**
Composés	mg/L	mg/L
Al	0	0,247
As	0	0,000569
Cs	0	0,000126
Ca	11,9	167
Cr	0	0,000657
Co	0,03	< 0,0002
Cu	0,08	0,0126
Fe	4,1	0,152
Mg	70	28,5
Mn	2	< 0,02
Mo	0,005	0,00508
Ni	0	0,0401
P	56,9	171
Pb	0	0,00295
K	97,5	637
Na	0,029	268
Zn	0,2	0,241

L'analyse ICP-MS du PDL concentré à 30 g/L montre une présence importante de phosphore, calcium, magnésium, potassium et sodium dans ce coproduit laitier. Or le phosphore sous forme de phosphate a été décrit comme inhibiteur de la production de C-PC (Wan et al., 2016a; Cagnac et al., 2017b).

L'identification et la quantification des ions présents dans le PDL a permis de lister les ions pouvant potentiellement impacter la production de C-PC : le calcium, le phosphore, le potassium ou le sodium sont présents en excès dans le PDL et en quantité supérieure au milieu de référence chimiquement défini.
Afin de comprendre quels sont les éléments du PDL pouvant limiter la production de C-PC intracellulaire, plusieurs essais ont été réalisés avec différentes concentrations de KH_2PO_4 (source de phosphore et potassium) et de CaCl2. L'effet du sodium (NaCl) avait été précédemment testé sur glucose et aucun impact n'avait été remarqué sur les productions de C-PC par *G. sulphuraria*. Nous avons validé l'action inhibitrice du phosphore à partir de 55mg/L comme l'avait prouvé Cagnac et al., 2017b sur glycérol. Plusieurs concentrations en $CaCl_2$ (4 à 250mg/L de calcium) ont été testées avec un milieu contenant du lactose et aucun impact n'a été constaté sur la pigmentation de la souche (Tab.11).

Tableau 11. Effet du calcium sur la production de C-PC

Ca (mg/L)	4	8	16	32	79	144	222
DO	35,7	39,3	35,6	34,6	35,5	35,2	36,8
PC (mg/gMS)	16,41	15,88	16,03	15,06	17,24	16,73	15,98

IV. Résultats

Parmi les éléments chimiques présents en excès dans PDL et identifié à l'ICP, le phosphore serait le seul ayant un effet sur la production de C-PC intracellulaire.

Une optimisation du milieu de culture a été réalisée de manière à diminuer l'apport de ces macronutriments. Cette modification nous a principalement conduit à éliminer le KH_2PO_4 et le $CaCl_2$ des milieux de culture contenant du PDL, cette suppression n'a eu aucun impact sur la croissance et la production de C-PC de la souche (Fig. 28). Cet ajustement a permis de limiter le nombre d'intrants dans la préparation du milieu de culture notamment celle du phosphore réducteur de la production de C-PC tout en ayant un intérêt économique et écologique car les éléments restants dans le milieu de culture en fin de procédé devront être retraités. De plus, la réduction de la concentration en micronutriments du milieu limite les risques d'inhibition de croissance par excès d'un élément nutritionnel lors des cultures à plus grande échelle sur des milieux plus concentrés.

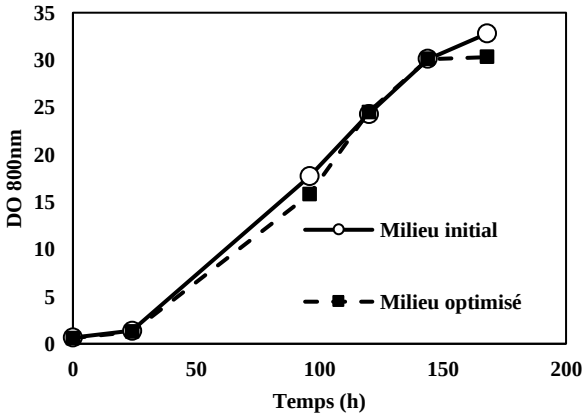


Figure 28. Comparaison de croissance de la souche UTEX2919 sur le milieu PDL initial et le milieu PDL optimisé (sans ajout de KH_2PO_4 et $CaCl_2$)

4. Évolution de la souche d'intérêt et élargissement des substrats de culture

La souche de *G. sulphuraria* UTEX2919 est une biomasse microalgale intéressante pour sa teneur en protéines (Graziani et al., 2013; Cagnac et al., 2017a et b) et sa capacité à consommer le lactose présent dans les coproduits lactés comme démontré-ci dessus. Cette espèce de *Cyanidiophycea* a également été choisie pour sa faculté à produire de la C-PC, ce pigment bleu apportant une forte valeur ajoutée à la biomasse microalgale. En parallèle du développement réalisé sur la souche sauvage avec des substrats purs, nous avons développé un axe de recherche visant à sélectionner des variants naturels de la souche UTEX2919 capable de produire de la C-PC sur un milieu contenant du PDL en hétérotrophie, comme cela a pu être réalisé par le passé avec d'autres substrats (Troxler et al., 1966 ; Gross et al., 1995).

a) Caractérisation d'une nouvelle souche d'intérêt

Une souche variante issue de la souche mère *G. sulphuraria* UTEX2919 a été sélectionnée sur un milieu de culture solide selon la méthode décrite (Partie II-A-1), ce nouveau variant a été nommée FCC3222. Cette méthode de sélection consiste à repiquer à l'obscurité la souche sauvage UTEX2919 sur un milieu PDL gélosé jusqu'à voir apparaître des colonies colorées.

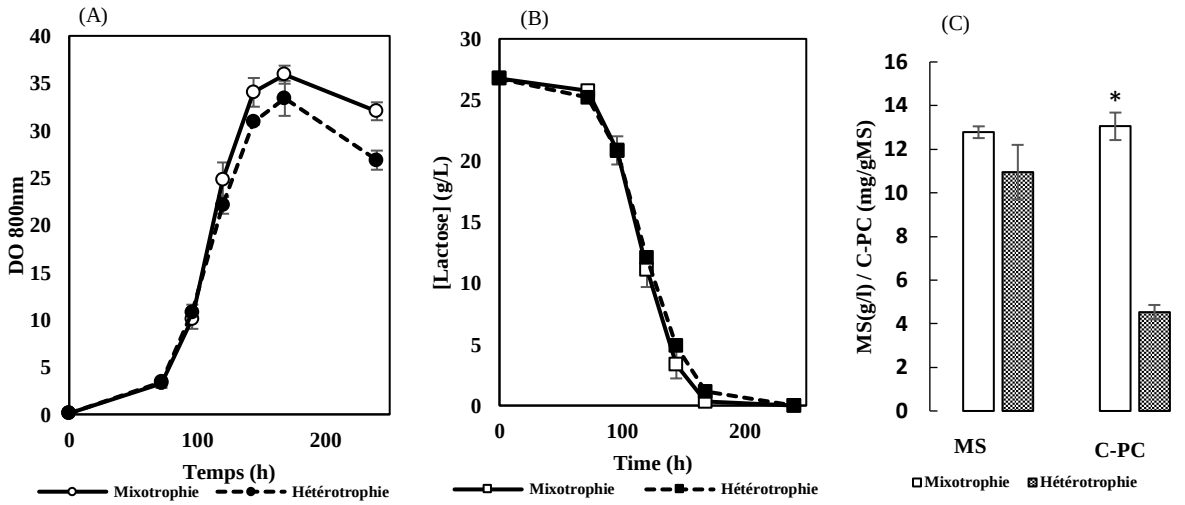


Figure 29. Caractérisation de la souche variante FCC3222 cultivée en mixotrophie et hétérotrophie sur perméat de lait. A) Suivi de la densité optique B) Suivi de la consommation en lactose C) Masse sèche et concentration spécifique en phycocyanine en fin de culture.

La souche FCC3222 est capable de croître en mixotrophie et en hétérotrophie de manière significativement identique sur un milieu PDL avec μ_{moyen} de 0,03 h^{-1} similaire à celui de la souche UTEX2919 (Fig. 23). Lors de cet essai la carence en lactose a provoqué une chute de la concentration cellulaire (MS) plus prononcée en hétérotrophie qu'en mixotrophie avec une diminution de l'absorbance de 20% en hétérotrophie contre 10% en mixotrophie. En fin de culture la MS de la souche cultivée en mixotrophie était de 12,78 g/L et 10,95 g/L pour l'hétérotrophie. La phase de latence de cette souche variante (75h) est identique à celle de la souche UTEX2919 après une adaptation à l'environnement de culture (Fig. 23 et 29). Au cours de la phase exponentielle de croissance de 96h, la souche FCC 3222 a consommé l'intégralité du lactose présent dans son milieu de culture aboutissant à un rendement r_{MSL} de biomasse sèche produite sur lactose consommé de 0,46 g_{MS}/g_L (Fig. 29. A, B). La souche FCC3222 a la capacité de produire de la C-PC en hétérotrophie a des teneurs de 4,5 mg/g_{MS} contrairement à la souche mère qui est incapable d'en produire à l'obscurité même après une longue adaptation (3 ans de repiquage sur ce milieu de culture). La teneur intracellulaire en C-PC en mixotrophie est exactement la même que pour la souche UTEX2919 adaptée. (Fig. 23 et 30C). En lumière ou à l'obscurité, le taux de croissance est similaire mais la production en C-PC reste 2,4 fois plus importante en présence de lumière, ce résultat est en corrélation avec ceux de Sloth et collaborateur (2006) qui observent une multiplication par 2 de la C-PC intracellulaire entre la culture en hétérotrophie et mixotrophie avec le variant 074G issu de la souche indonésienne (80µmol photon/m^2/s).

Tableau 12. Composition cellulaire de la souche FCC3222 en fin de culture.

	Mixotrophie	Hétérotrophie
Sucres totaux (% MS)	29,09	27,95
Écart type	2,99	0,73
Azote total (%N MS)	6,60	6,68
Écart type	0,08	0,08
Protéines (% MS)	41,25	41,77
Écart type	0,51	0,52

Selon son mode culture la souche de *G. sulphuraria* est capable d'accumuler des sucres de réserves (Martinez-Garcia et al., 2016) que nous estimons en mesurant la teneur en sucres totaux de la biomasse. La composition cellulaire en protéines et en sucres totaux de la souche FCC3222 n'a pas variée entre les conditions mixotrophe et hétérotrophe avec des teneurs de

41%MS et 28-29%MS respectivement. Le mode trophique n'influencerait pas l'orientation du métabolisme carboné vers la production de sucre totaux ou de protéines. Par comparaison avec la teneur protéique de la souche mère UTEX2919 mesurée lors des premiers essais (Fig. 20B) celle de la souche FCC3222 est 10 à 15% plus faible. Suite à ce résultat la proportion en protéine de la souche UTEX2919 adaptée au milieu PDL a été remesurée et sa teneur protéique était également aux alentours de 40%MS, cela signifierait qu'en ayant un taux de croissance supérieur la proportion de protéine intracellulaire serait réduite.

La poursuite des essais et de la mise au point du procédé a été réalisée sur la souche FCC3222 car cette souche était acclimatée au milieu de culture PDL avec un μ_{moyen} de 0,03 h^{-1} en mixotrophie et hétérotrophie qu'elle détenait la capacité de production en C-PC supérieure.

b) Étude du développement de la souche FCC 3222 sur plusieurs coproduits lactosés de l'industrie laitière

La nature et la composition des coproduits de l'industrie laitière peuvent varier en fonction du procédé de production d'où ils proviennent. Les lactosérums et les perméats peuvent contenir une grande quantité de minéraux (Tab. 10), d'acides organiques (Tab. 13), des restes de protéines de lait non extraites (Smith, 2008).
La concentration en ions et acides organiques de ces substrats complexes peut avoir un effet inhibiteur sur le développement d'une souche microbienne. Plusieurs coproduits ont été testés afin d'identifier les capacités de la souche FCC3222 à croître dans ces environnements de culture avec les paramètres validés précédemment en fioles Erlenmeyer (mixotrophie à 60 µmol/m^2/s, 30 g/L de substrat complexe, 37°C, pH 3, agitation à 140rpm).

Tableau 13. Teneur en acides organiques et lactose de coproduits laitiers (30 g/L de poudre)

Composés	Lactosérum acide	Lactosérum doux	Perméat de lactosérum doux
Acide citrique (g/L)	2,45	2,99	2,74
Acide succinique (g/L)	0,67	1,04	1,64
Acide lactique (g/L)	2,98	0,90	1,30
Lactose (g/L)	23,81	21,44	24,66

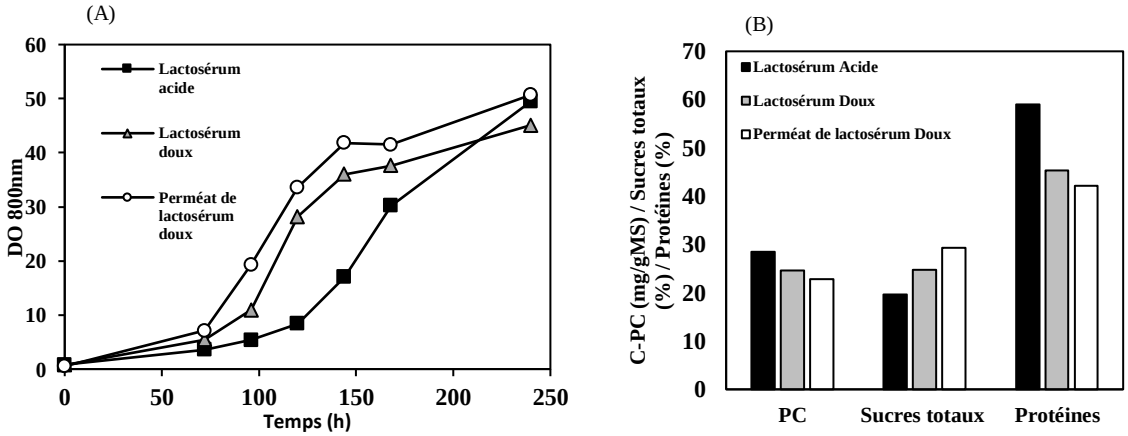


Figure 30. Croissance et composition cellulaire de la souche FCC3222 sur différents coproduits lactés A) Suivi de croissance B) Composition de la biomasse en fonction du substrat utilisé en fin de culture.

La souche FCC3222 s'est développée sur l'ensemble des coproduits testés. Cependant, la phase de latence a été plus courte sur le milieu contenant du perméat de lactosérum doux que sur le lactosérum doux, avec un léger retard de croissance observé en début de culture, le taux de croissance lors de la phase exponentielle est identique sur ces deux substrats (μ_{moyen} 0,03 h^{-1}).

IV. Résultats

Le lactosérum doux a une concentration légèrement plus faible en acides organiques que le perméat. Le perméat de lactosérum est le coproduit résultant de la séparation des protéines du lactosérum, ainsi une des différences entre ces deux substrats est la concentration en protéines résiduelles. La présence de ces protéines pourrait rallonger la phase de latence de la souche FCC3222 lors d'une culture sur lactosérum. Lors de la préparation du milieu de culture le pH est ajusté à 3 ce qui provoque la précipitation de ces protéines résiduelles des coproduits laitiers mais ces protéines précipitées pourraient tout de même influencer négativement la croissance de la souche microalgale.

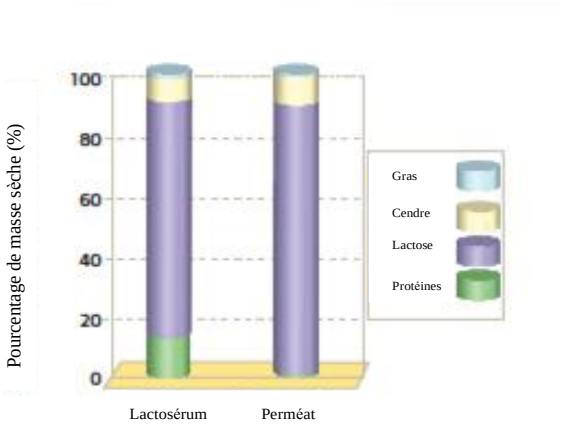


Figure 31. Composition du lactosérum et perméat (Smith, 2008)

La souche cultivée sur un milieu de culture contenant du lactosérum acide a eu une phase de latence plus longue et un taux de croissance plus faible lors de la phase exponentielle de croissance (μ_{moyen} 0,025h^{-1}). La composition du lactosérum acide, riche en acide lactique 2,98g/L, pourrait influencer le développement d'une souche de *G. sulphuraria* (Fig. 30A).
La quantité de C-PC intracellulaire est de 28,5 mg/g_{MS} pour le lactosérum acide, 24,5 mg/g_{MS} pour le lactosérum doux et 22,8 mg/g_{MS} pour le perméat de lactosérum, la teneur en protéines est de 59%MS pour la souche cultivée sur lactosérum acide, 45%MS sur le milieu contenant du lactosérum doux et 42%MS sur le perméat de lactosérum doux. La composition en sucres totaux est comprise entre 19,7%MS et 29,3%/MS en étant inversement proportionnelle à la teneur en protéines (Fig. 30B). La présence d'acides organiques et de protéines résiduelles peut impacter le taux de croissance et la phase de latence de la souche mais la souche *G. sulphuraria* a un forte capacité d'adaptation et fini tout de même par se développer sur ces coproduits laitiers.

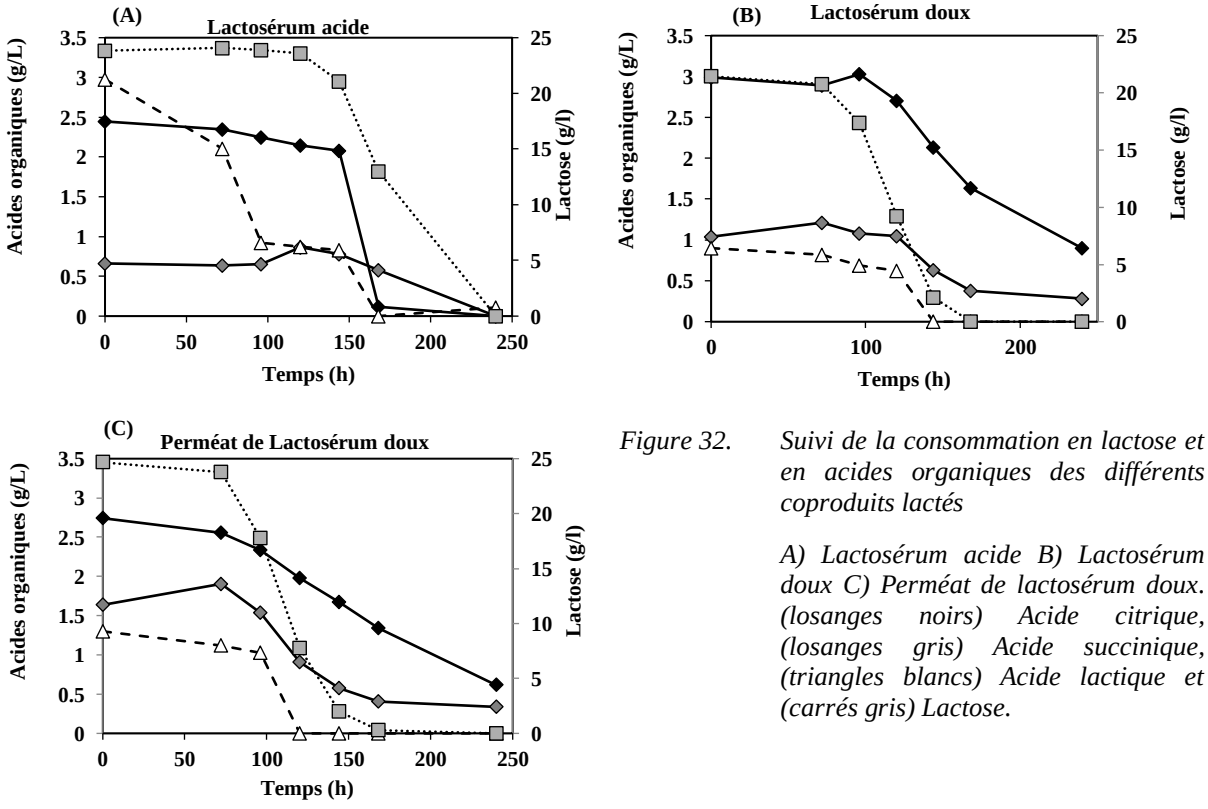


Figure 32. Suivi de la consommation en lactose et en acides organiques des différents coproduits lactés

A) Lactosérum acide B) Lactosérum doux C) Perméat de lactosérum doux. (losanges noirs) Acide citrique, (losanges gris) Acide succinique, (triangles blancs) Acide lactique et (carrés gris) Lactose.

IV. Résultats

Après 240h de culture la souche FCC3222 a consommé la totalité du lactose présent dans les 3 coproduits laitiers. Lors de la culture sur lactosérum acide l'intégralité des acides organiques est consommée. De façon surprenante l'acide lactique est consommé avant le lactose pour des concentration supérieure à 1 g/L, en dessous de cette concentration les deux substrats sont consommés de façon concomitante. La souche FCC3222 aurait une préférence pour l'acide lactique plutôt que pour le lactose, il pourrait y avoir une répression catabolique de l'acide lactique sur le lactose pour des concentrations supérieures à 1 g/L. Les autres acides organiques sont co-consommés avec le lactose (Fig. 32A). Sur le lactosérum doux et le perméat de lactosérum doux, la souche FCC3222 n'a pas utilisé la totalité de l'acide citrique et succinique présents dans le milieu (Tab. 14)(Fig. 32B, C).

Tableau 14. Pourcentage des éléments consommés en fin de culture

% consommé en 240h	Lactosérum acide	Lactosérum doux	Perméat de lactosérum doux
Acide citrique	100	70	77,6
Acide succinique	100	72,8	79,5
Acide lactique	100	100	100
Lactose	100	100	100

Suite à cet essai nous avons émis l'hypothèse que les acides organiques pouvaient avoir un effet positif sur la pigmentation de la souche tout comme nous l'avons remarqué dans la condition avec du lactosérum acide (Fig. 30B). C'est pourquoi l'impact de l'acide citrique et de l'acide lactique a été testé en suivant la croissance et la teneur intracellulaire en C-PC sur des milieux de culture PDL contenant de l'acide lactique ou citrique. Ces essais ont montré que l'acide lactique pouvait avoir un effet inhibiteur sur la souche FCC3222. Une réduction de la croissance a été observée en présence d'acide lactique dans des concentrations comprises entre 0,6 et 1,2g/L et une forte inhibition pour des concentrations supérieures à 1,8 g/L ou plus d'acide lactique sans pour autant aboutir à la mort cellulaire de la souche (DO initiale de 0,2 et DO finale de 1,6). Dans les milieux détenant une concentration inférieure à 1,2 g/L d'acide lactique, aucun impact sur la croissance et sur la teneur intracellulaire en C-PC n'a été constaté (Données non présentées).

Des concentrations en acide citrique agent chélateur reconnu comprises entre 3,2 et 7 g/L n'ont pas eu d'effet sur la croissance et la production de C-PC de la souche FCC3222.

La teneur en protéines des coproduits laitiers peut avoir un effet sur la pigmentation et cela pourrait expliquer le retard de croissance remarqué entre la croissance sur le lactosérum doux et le perméat de lactosérum doux (Fig. 30A). Un essai avec différentes concentrations (1, 2, 4 g/l) en peptone de caséine ajoutées à un milieu sur lactose pur à faible concentration en phosphate a été réalisé. Le PDL utilisé pour le développement de ce procédé est lui-même composé de 4 g/l de protéines et ces protéines sont précipitées lors de la préparation du milieu de culture à pH 3.
Comme évoquer, la teneur en protéines des coproduits laitiers peut également avoir un effet sur la pigmentation et cela pourrait expliquer le retard de croissance remarqué entre la croissance sur le lactosérum doux et le perméat de lactosérum doux (Fig. 30A). Un essai avec différentes concentrations (1, 2, 4 g/l) en peptone de caséine ajoutées à un milieu lactose pur à faible concentration en phosphate a été réalisé. Le PDL utilisé pour le développement de ce procédé est lui-même composé de 4 g/l de protéines et ces protéines sont précipitées lors de la préparation du milieu de culture à pH 3. Un essai de culture réalisé sur un milieu PDL dont les protéines précipitées ont été retirées du milieu nous a permis d'observer que la souche gardait la même tendance de production de C-PC qu'avec un milieu dans lequel ces protéines étaient présentes (Données non présentées).

Compte tenu des conditions de stérilisation du milieu (pH3 et autoclavage à 121°C), il est envisageable qu'une partie de ces protéines soient hydrolysées et que les peptides et/ou acides aminés libérés dans le milieu contribuent à réduire la production de C-PC.
Cette hypothèse a par la suite été confirmée par des essais sur milieu lactose pur en présence de différentes concentrations de peptone de caséine (Annexe 2). Les fortes teneurs en peptone dans le milieu de culture ont pour conséquence d'augmenter le temps de latence et d'inhiber la production de C-PC, la souche FCC3222 ne pigmente plus en présence d'une concentration supérieure à 1 g/l de peptone de caséine.

c) Mélange de substrats carbonés

Il est très largement décrit dans la littérature que la quantité de C-PC produite en mixotrophie est inférieure à celle produite en autotrophie (Moriyama et al., 2015). La synthèse de C-PC serait inhibée par la présence de substrat carboné organique dans le milieu de culture et d'autant plus en présence de glucose que de glycérol. Lors des essais précèdents nous avions pu constater que la production de C-PC était supérieure lors d'une culture sur glycérol ou lactose pur comparé aux cultures sur glucose et PDL. La pigmentation des cellules de *G. sulphuraria* pouvant être modifiée en fonction du substrat de culture nous voulions mesurer l'effet que pouvait avoir un mélange de substrat sur la production de C-PC. L'idée de l'essai était d'observer s'il pouvait y avoir une « levée » d'inhibition en présence d'une faible quantité de glycérol (substrat permettant une production de C-PC plus élevée) dans un milieu contenant du PDL (faible production de C-PC), l'objectif étant d'activer la production de C-PC ou de réduire l'inhibition provoquée par le PDL dans le milieu de culture.

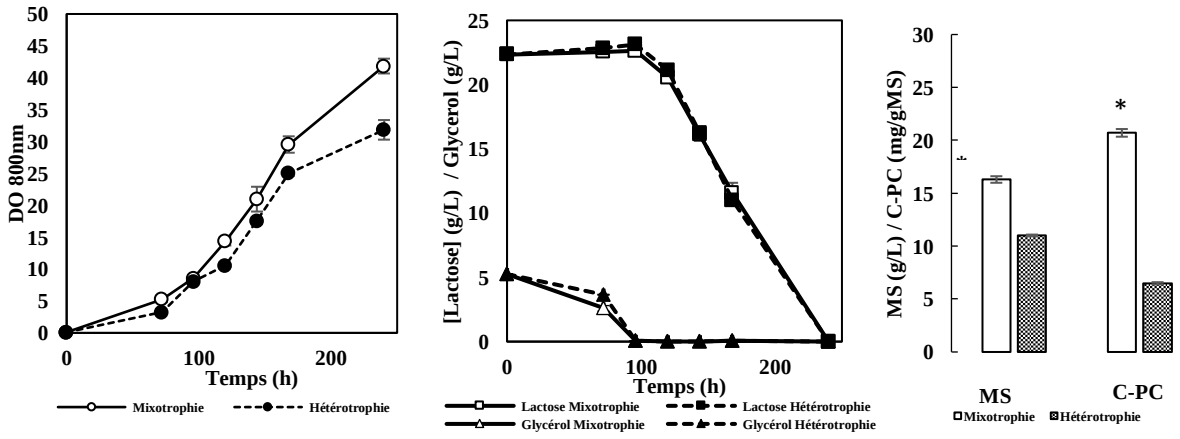


Figure 33. Caractérisation du développement de la souche FCC 3222 sur un mélange de substrat (Perméat de lait + glycérol) en mixotrophie et hétérotrophie A) Suivi de croissance B) Suivi de la consommation des substrats C) Masse sèche et concentration intracellulaire en phycocyanine en fin de culture.

La souche FCC 3222 s'est développée sur un milieu de culture contenant un mélange de substrat (25 g/L de PDL et 5 g/L de glycérol), la croissance de la souche FCC 3222 en hétérotrophie et mixotrophie a été significativement identique jusqu'à 168h de culture avec un $\mu_{max} = 0{,}02h^{-1}$). Après 168h un ralentissement de croissance a été observé pour les deux conditions mais ce ralentissement a été plus fort en hétérotrophie qu'en mixotrophie ce qui a conduit à une DO finale supérieure en mixotrophie (Fig. 33A). Quelle que soit la condition de culture, la concentration en lactose dans le milieu diminue uniquement après que l'intégralité du glycérol ait été consommée (Fig. 33B). La concentration finale en MS en mixotrophie est de 16 g/L avec une teneur intracellulaire en C-PC de 20,7 mg/g_{MS} et en hétérotrophie 11 g/L de MS avec 6,11 mg/g_{MS} de C-PC (Fig. 33C).

IV. Résultats

En comparant la production de C-PC sur ce mélange de substrats aux valeurs de C-PC produites lors d'une culture sur un milieu uniquement composé de PDL (Fig. 29), on constate que la teneur intracellulaire en C-PC est multipliée par 1,6 en mixotrophie et par 1,41 en hétérotrophie sur le mélange Glycérol-PDL (Fig. 33). L'ajout de 5g/l de glycérol dans un milieu contenant du PDL stimule la production de C-PC (20,7 mg/g_{MS} pour le mélange et 13mg/g_{MS} pour le PDL seul en mixotrophie). Le taux de croissance de la souche FCC3222 sur le mélange est réduit avec un μ_{moyen} de 0,017h^{-1} au lieu de 0,03h^{-1} sur le milieu PDL. L'augmentation de la C-PC en présence de glycérol peut s'expliquer soit par une activation de la voie de biosynthèse de la C-PC, soit comme une levée de l'inhibition appliquée par des composés du PDL sur la synthèse de C-PC.

5. Développement d'un procédé Fed-batch en bioréacteur de laboratoire

Après avoir défini la composition du milieu et les paramètres de culture à appliquer lors du procédé de production, une montée en échelle en bioréacteur permet de cultiver la souche dans des conditions contrôlées (pH, température, pO2, source de carbone organique), ce contrôle des paramètres permet d'atteindre de fortes densités cellulaires. Cette biomasse peut être utilisée pour différentes analyses et essais d'extraction et purification des molécules d'intérêt. La totalité des paramètres de culture en fioles Erlenmeyer ne pouvant pas être régulés, l'apport en oxygène devient un facteur limitant lorsque la densité cellulaire augmente et les échanges ioniques liés à la croissance peuvent faire varier le pH du milieu de culture et provoquer une réduction de croissance. En bioréacteur la pression partielle en oxygène est contrôlée par l'agitation et l'ajout d'air de manière à ne pas être limitante, et le pH est régulé afin de n'avoir aucune limitation de croissance liée à ce paramètre.

a) Culture Fed-Batch sur le milieu perméat de lait en mixotrophie et hétérotrophie

La souche FCC3222 est cultivée en bioréacteur avec des conditions de culture contrôlées : la consigne de pH est fixée à 3 avec une régulation acide à l'acide sulfurique 4N et alcaline avec de l'ammoniaque 14% (p/v). La consigne basse de pO2 est fixée à 30% d'oxygène dissous et est régulée par deux facteurs en cascade, l'agitation et le débit d'aération. La consigne de température à 37°C est régulée par la double enveloppe. Une contre-pâle lumineuse blanche est insérée dans le bioréacteur. L'intensité lumineuse de celle-ci est ajustable et permet d'apporter un signal lumineux pouvant influencer la production de pigment d'une culture microalgale en mixotrophie.
La première étape de culture en bioréacteur qui est nommée phase « Batch » permet d'initier la croissance de la souche dans un milieu pied de cuve identique à celui des cultures en fioles Erlenmeyer (Partie III-C-2).

L'intensité lumineuse est ajustée à 2000 µmol/m^2/s lors de la phase Batch afin d'apporter une énergie lumineuse sans inhiber la croissance. La densité cellulaire augmentant, la diffusion de la lumière dans la biomasse est réduite c'est pourquoi l'intensité lumineuse est augmentée à 5000 µmol/m^2/s lors de la phase Fed-batch afin d'essayer d'optimiser l'induction des gènes par la lumière dans la majorité des cellules. Le milieu d'alimentation ajouté au cours de la phase Fed-batch est concentré à 100 g/L de PDL ce qui correspond à 78 g/L de lactose. L'addition de ce milieu dans le bioréacteur suit un profil d'ajout exponentiel calculé de manière à apporter la quantité nécessaire à la croissance de la souche (μ imposé) tout en ayant une concentration résiduelle en lactose de 0 g/L.

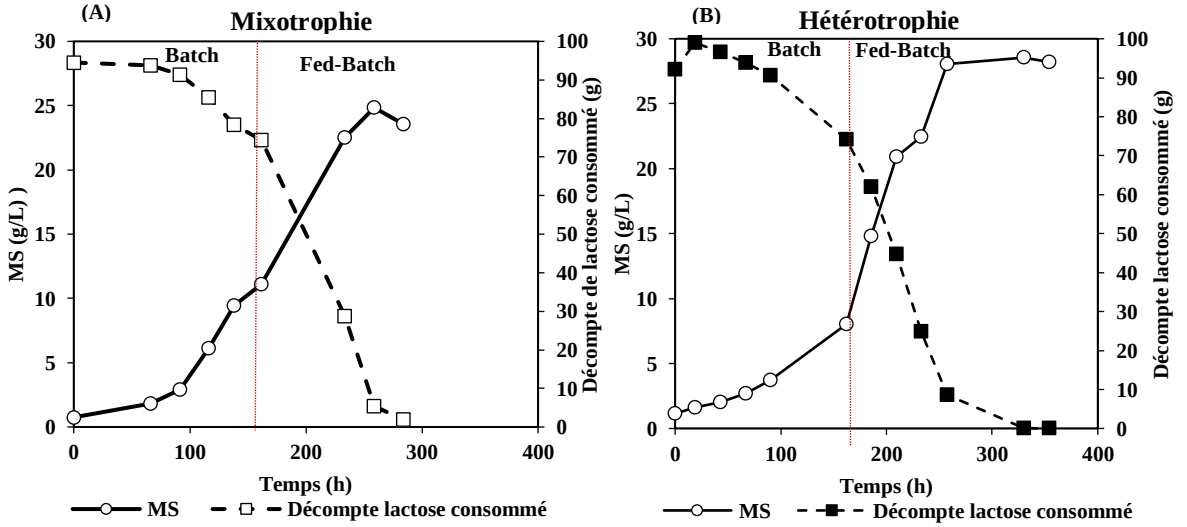


Figure 34. Culture Fed-batch de la souche de G. sulphuraria FCC 3222 sur perméat de lait avec 25 g/L de lactose dans le pied de cuve pour la phase batch et 78 g/L de lactose dans le milieu d'alimentation. A) Mixotrophie B) Hétérotrophie. La ligne discontinue rouge signale le passage à la phase Fed-batch

La culture de la souche FCC3222 atteint une concentration cellulaire de 25 g/L en 258 h en mixotrophie (Fig. 34A) et 28 g/L en hétérotrophie (Fig. 34B). La vitesse de consommation du lactose a suivi la tendance de la vitesse de production de biomasse avec un rendement moyen sur le lactose présent dans le PDL de 0,47 g_{MS}/g_L au cours de la culture en mixotrophie et 0,45g_{MS}/g_L en hétérotrophie. En mixotrophie, la productivité moyenne instantanée en biomasse sèche r_{MS} est de 0,134 g/L/h avec une vitesse de consommation du lactose instantanée r_L à 0,284g/L/h et en hétérotrophie r_{MS} = 0,109 g/L/h et r_L = 0,283 g/L/h.

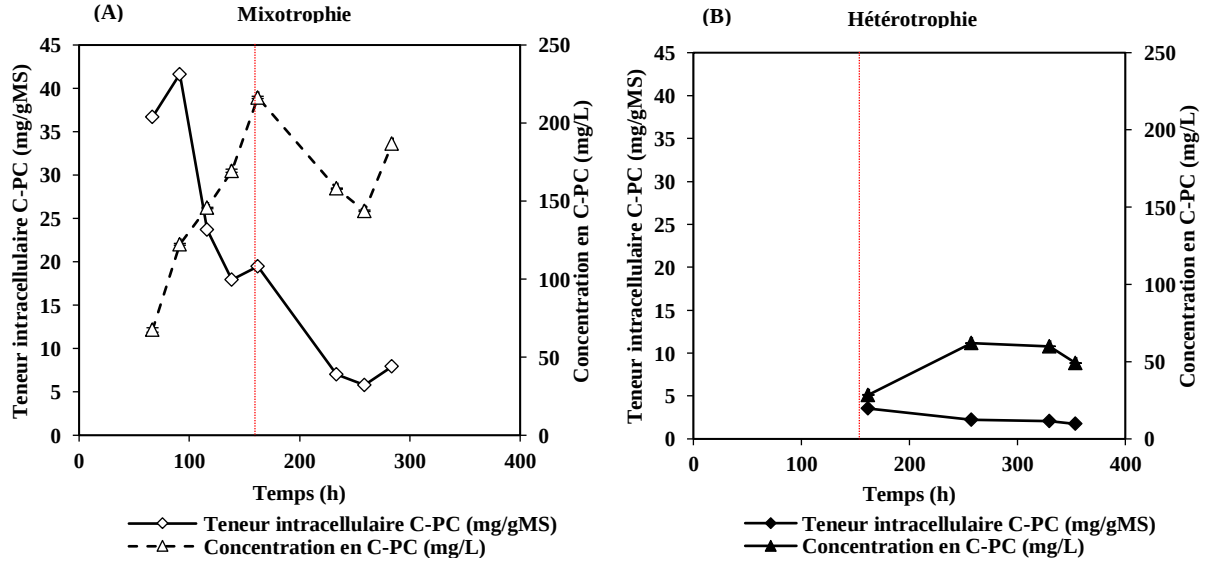


Figure 35. Suivi de la teneur intracellulaire et de la concentration en C-PC A) Mixotrophie et B) Hétérotrophie. La ligne discontinue rouge signale le passage à la phase Fed-batch.

La teneur intracellulaire de C-PC dans la biomasse est mesurée sur une quantité définie de biomasse et est exprimée en mg de C-PC par g de biomasse (mg/g_{MS}). La concentration en C-PC en mg/L se calcule à partir de la teneur intracellulaire et prend en compte la concentration cellulaire de la biomasse sèche (MS) ce qui donne une quantité globale de C-PC dans le moût de fermentation. Lorsque la souche est cultivée à la lumière, une forte production de C-PC intracellulaire est observée en début de la phase exponentielle 41,65 mg/g_{MS} et cette teneur en C-PC diminue au cours de la phase Fed-Batch et atteint un taux de 8 mg/g_{MS} en fin de culture. La courbe de corrélation de la teneur intracellulaire en C-PC en fonction de la quantité de

biomasse n'est pas complètement linéaire avec un coefficient de détermination égal à 0,76 (Fig. 36) mais démontre clairement la tendance de la C-PC à diminuer tout au long de la croissance. Ce phénomène peut être la conséquence de l'addition de plusieurs facteurs, l'ajout du milieu d'alimentation contenant du PDL au cours de la phase Fed-Batch peut provoquer une diminution de la production en C-PC. De plus l'augmentation de la densité cellulaire au cours du procédé de production diminue le temps de passage à lumière des cellules. L'induction par la lumière de certains gènes intervenant dans la production de C-PC pourrait ne pas être effective à haute densité cellulaire.

La culture en hétérotrophie conduit à une faible production intracellulaire en C-PC allant de 3,54 mg/g_{MS} à 1,74 mg/g_{MS} durant la phase Fed-batch. Il semblerait que l'ajout du milieu d'alimentation réduise la teneur intracellulaire en C-PC tout comme observé en mixotrophie mais il est difficile de conclure avec ce faible écart de production.

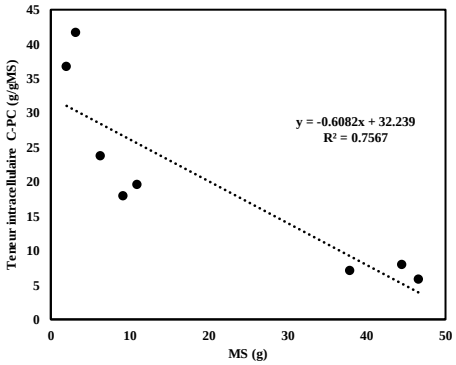


Figure 36. *Courbe de corrélation de la C-PC en fonction de la MS.*

En mixotrophie, la concentration de C-PC dans le moût de fermentation a augmenté au cours de la phase Batch malgré la baisse de la teneur intracellulaire en C-PC, ce phénomène résulte de l'augmentation de la concentration en biomasse sèche (MS). Certes la proportion en C-PC dans une cellule diminue mais étant donné que le nombre de cellule est en hausse, la concentration globale en C-PC dans le bioréacteur augmente. Au cours de la phase Fed-Batch, la teneur intracellulaire en C-PC (mg/g_{MS}) diminue tellement que la concentration globale (g/L) finit également par baisser. Une hausse de la teneur intracellulaire en C-PC est remarquée entre 258 h et 284 h, cette augmentation est corrélée avec la baisse de masse sèche entre ces deux points.

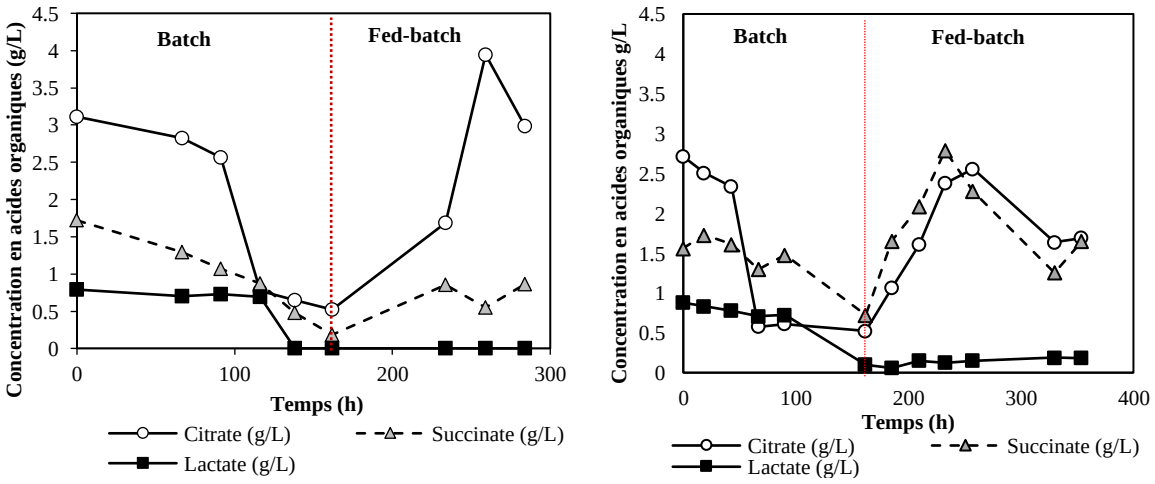


Figure 37. *Suivi de la concentration en acides organiques lors du procédé en mixotrophie.*

La concentration de certains acides organiques présents dans le PDL diminue dès les premiers temps de culture en phase batch ce qui reflète la consommation de ces éléments. Le milieu d'alimentation à 100 g/L de PDL contient 3 g/L d'acide lactique, 6 g/L de d'acide succinique

et 10 g/l d'acide citrique. La totalité de l'acide lactique est consommée au cours du procédé de production en mixotrophie et en hétérotrophie, 85% d'acide succinique est utilisée par la souche en mixotrophie et 70% en hétérotrophie et la quantité d'acide citrique apportée est diminuée de 74% en mixotrophie et 85% en hétérotrophie. Ces résultats sont cohérents avec les données de consommation d'acides organiques que nous avions obtenues lors des essais en fioles Erlenmeyer (Tab. 14)

Tableau 15. Indicateurs de performances de la culture FCC 3222 en Fed-Batch

Phase exponentielle	**Mixotrophie**	**Hétérotrophie**
μ_{moyen} (h-1)	0,022	0,02
r_{MS} (g_{MS}/L/h)	0,08	0,09
Rendement moyen sur lactose R_{MSL} (g_{MS}/g_L)	0,47	0,45
r_L (g_L/L/h)	0,284	0,283
En fin de procédé		
Teneur intracellulaire C-PC (mg/gMS)	7,93	1,74
Productivité $r_{C\text{-}PC}$ (mg/L/h)	0,66	0,14
Productivité r_P (g/L/h)	0,046	0,055

Les performances de croissance de la souche FCC 3222 sont similaires en hétérotrophie et mixotrophie (rMS 0,08-0,09 g_{MS}/L/h ; Tab. 15), la productivité en protéines est légèrement supérieure en hétérotrophie grâce à la plus forte teneur protéique de la biomasse dans cette condition mais la productivité en C-PC est presque 5 fois supérieure en présence de lumière (Tab. 16).

Tableau 16. Composition cellulaire de la souche FCC 3222 en fin de Fed-batch

Composition cellulaire	**Protéines (%)**	**Sucres totaux (%)**	**C-PC (mg/g_{MS})**
Mixotrophie	34	42	7,93
Hétérotrophie	44	22,4	1,74

En fin de procédé de production Fed-batch, la biomasse récupérée en condition de mixotrophie est composée de 34% de protéines dont 0,793% de C-PC et 42% de sucres totaux. La biomasse issue du bioréacteur en hétérotrophie est composée de 44% de protéines dont 0,17% de C-PC et de 22,4% de sucres totaux (Tab. 16). Nous n'avions pas observé de différence de composition cellulaire en fioles Erlenmeyer pour la souche FCC3222 cultivé en mixotrophie et hétérotrophie. De plus c'est l'effet inverse qui est décrit dans la littérature avec une plus importante production de carbohydrate en absence de lumière et plus de protéine intracellulaire en présence de lumière (Graziani et al., 2013).

b) Culture Fed-Batch sur le milieu lactose pur en mixotrophie

Le même pilotage du procédé de production a été effectué en utilisant un milieu contenant du lactose pur, l'objectif étant d'évaluer concrètement l'effet que peuvent avoir les composés du PDL sur la productivité en biomasse et protéines dont C-PC.

(1) Suivi des performances

La conduite appliquée lors de cette culture en mode Fed-batch sur le milieu contenant du lactose est strictement identique à celle du milieu PDL en mixotrophie avec les mêmes paramètres de culture. La seule différence sur ce procédé comparé à celui sur PDL (partie IV-A-5-a) se trouve dans la composition du milieu de culture (pied de cuve et milieu d'alimentation) contenant du lactose pur et non du PDL mais la concentration finale en lactose reste la même (78 g/L).

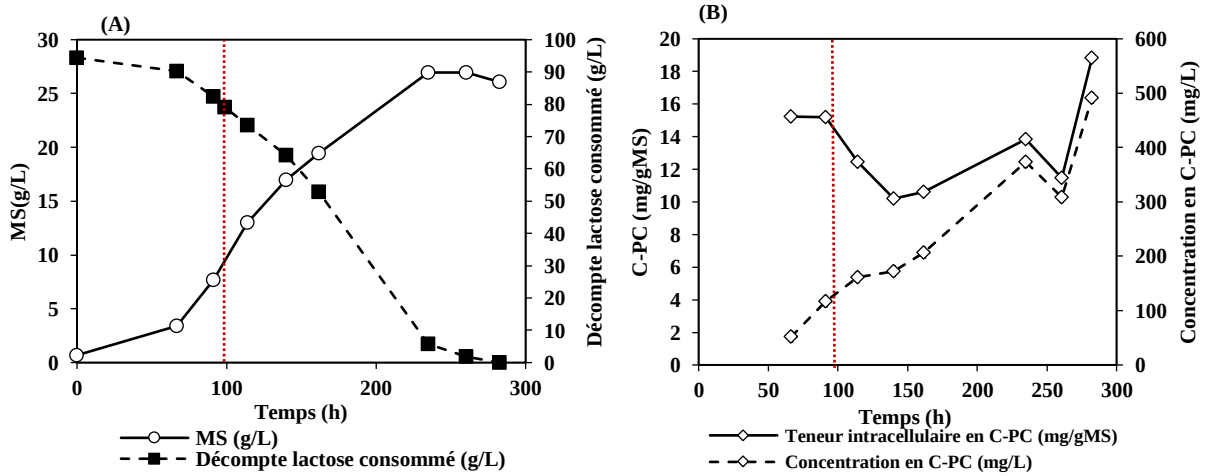


Figure 38. Culture Fed-batch de la souche de G. sulphuraria FCC3222 sur lactose pur. A) Suivi de croissance et de consommation du lactose B) Teneur intracellulaire et concentration globale de C-PC

La souche FCC3222 s'est développée de manière efficace lors de ce procédé de production sur lactose pur, la MS atteinte était de 26,95 g/L en 260 h de culture avec un taux de croissance μ_{max} de 0,022 h^{-1} imposé au cours de la phase Fed-batch. La productivité en biomasse r_{MS} moyenne était de 0,13 g/L/h, et le rendement moyen de conversion du lactose en biomasse r_{MSL} est de 0,48 g_{MS}/g_L. La teneur intracellulaire en C-PC est stable à 15 mg/g_{MS} au cours de la phase Batch, puis se situe aux alentours de 12 mg/g_{MS} au cours de la phase Fed-batch. Enfin, elle atteint une valeur de 18,84 mg/g_{MS} en phase stationnaire. La concentration globale de C-PC n'a fait qu'augmenter au cours du procédé de production excepté à 308 h où une baisse inexpliquée de la teneur intracellulaire en C-PC a été constatée.

(2) Comparaison avec le procédé sur perméat de lait

Tableau 17. Comparatif des performances entre le procédé de production sur PDL et lactose pur

Procédés de production en mixotrophie	PDL	Lactose
Temps de culture (h)	284	260
MS finale (g/L)	23,56	26,9
r_{MS} (g/L/h)	**0,08**	**0,1**
Lactose consommé (g)	94,5	94,4
Teneur intracellulaire finale C-PC (mg/g_{MS})	7,93	18,84
$r_{C\text{-}PC}$ (mg/L/h)	**0,66**	**1,74**
r_P (mg/L/h)	**0,027**	**0,033**

La croissance de la souche FCC3222 est similaire dans ces deux procédés de production réalisés en mixotrophie avec un même temps de culture, une MS et une quantité de lactose consommée significativement identiques. Une différence de production de C-PC est observée et confirme les résultats obtenus en fioles Erlenmeyer (Fig. 22). La souche FCC3222 a une teneur intracellulaire en C-PC en fin de culture plus de 2 fois supérieure lors du procédé sur lactose seul, la productivité en C-PC est donc deux fois plus importante sur ce substrat comparé au milieu PDL. Ces résultats confirment ceux obtenus en fioles Erlenmeyer et démontrent l'effet inhibiteur sur la production de C-PC de certains éléments du PDL (phosphore et protéines résiduelles). La composition intracellulaire en protéines est identique pour les deux procédés de production (34%MS et 33%MS).

c) Culture Fed-Batch sur un mélange glycérol-perméat de lait en mixotrophie

À la suite de l'observation de l'effet positif du glycérol sur la pigmentation de la souche cultivée en milieu PDL lors de l'essai en fioles Erlenmeyer (Fig. 33), les mêmes essais ont été testés en condition Fed-Batch en bioréacteur en mixotrophie.

(1) Suivi du procédé de culture

Cette expérience consistait à réaliser une culture Batch avec un pied de cuve composé d'un mélange de substrat dans les mêmes proportions que dans l'essai en fioles Erlenmeyer (5g/L de glycérol et 25g/L de PDL) suivi d'une phase Fed-batch avec des ajouts d'un milieu d'alimentation concentré à 83 g/l de PDL et 17 g/l de glycérol.

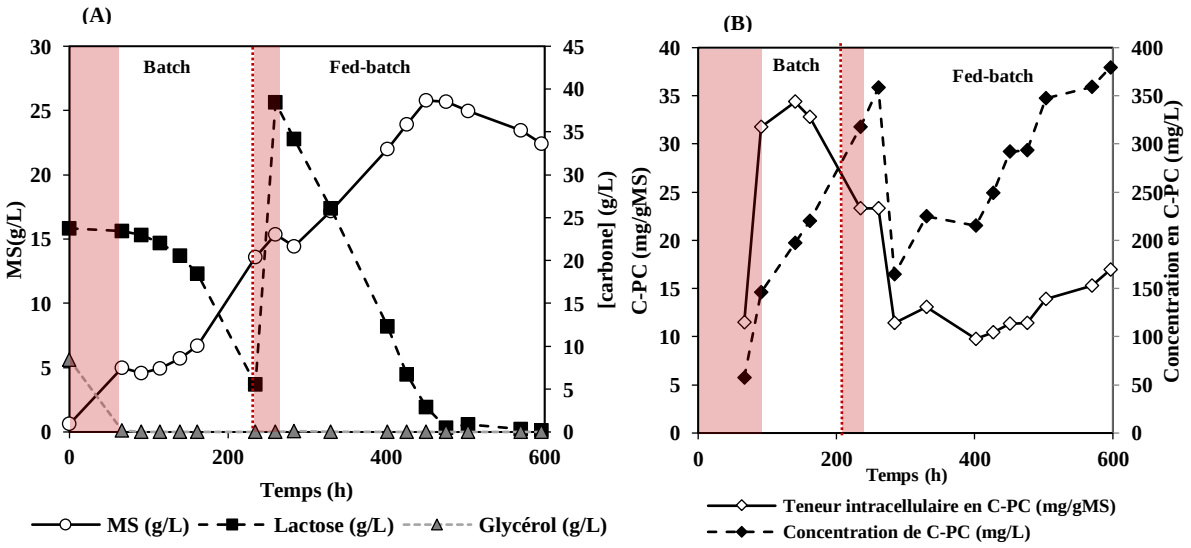


Figure 39. Culture Fed-Batch de la souche G. sulphuraria FCC3222 sur un mélange de substrat PDL-glycérol) en mixotrophie A) Suivi de la croissance et de la consommation en substrats B) Teneur intracellulaire et concentration en C-PC. En rosé sont représentées les périodes de consommation du glycérol et la ligne discontinue rouge signale le passage à la phase Fed-batch.

La souche *G. sulphuraria* FCC3222 cultivée sur un mélange de substrat consomme initialement la totalité de la quantité de glycérol présente dans le milieu pied de cuve (5 g/l) et ce n'est qu'après la disparition du glycérol qu'elle consomme le lactose, à partir de 140 h de culture. Il semblerait que la souche FCC 3222 ait une préférence pour le glycérol par rapport au lactose tout comme ce qui a été observé en fioles Erlenmeyer (Fig. 33). Le passage entre la consommation du glycérol et celle du lactose concorde avec un ralentissement de la croissance entre 66 h et 140 h, période durant laquelle la densité cellulaire reste stable à 5 g/L. Ce temps

de latence pourrait être la conséquence d'un changement de métabolisme carboné et serait alors le temps de l'induction de la voie métabolique du lactose. Le reste de la phase batch de 140 h à 260 h se poursuit par une croissance exponentielle et une consommation du lactose présent dans le milieu de culture. Le taux de croissance calculé sur la phase de consommation du glycérol est de 0,025 h^{-1} alors que celui calculé sur la phase de consommation du lactose est de 0,008 h^{-1}. Ce phénomène est appelé diauxie.
La phase Fed-Batch correspond à l'ajout du milieu d'alimentation concentré à 70g/L lactose (83 g/l PDL) et 17 g/l de glycérol. Lors du déclanchement de l'alimentation la croissance reprend tout de suite sans temps de latence. La concentration en glycérol résiduelle dans le milieu est nulle, alors que le lactose n'est pas consommé et s'accumule au cours de cette phase Fed-Batch (38 g/l de lactose résiduel).
Le passage entre la consommation du lactose vers celle du glycérol (au début de la phase Fed-batch) ne s'est pas traduit par un temps de latence lié à un changement métabolique comme lors de la transition glycérol vers lactose. Après l'arrêt de l'alimentation, la croissance s'est poursuivie jusqu'à ce que toutes les sources de carbone soient consommée (470 h), la biomasse a fini par atteindre 25 g/L de MS.

Au cours de la phase Batch, lors de la consommation de glycérol jusqu'à 72 h de culture la souche contient 32 mg/g_{MS} de C-PC, lors de la phase de transition de source carbonée entre 72 h et 140 h, la teneur intracellulaire de la souche a augmenté jusqu'à 34 mg/g_{MS}. La phase de consommation du lactose de la phase Batch est corrélée avec la diminution de la teneur intracellulaire en C-PC de 32,8 mg/g_{MS} à 23 mg/g_{MS}. Le début de la phase Fed-Batch a commencé par une stabilisation de la teneur intracellulaire en C-PC et par une augmentation de sa concentration globale dans le bioréacteur. Cette première étape reflète la phase de consommation du glycérol de 234 h à 260 h. Lors de la deuxième partie de la phase Fed-Batch, seul du lactose reste dans le milieu de culture (260 h à 475h) et sa consommation a abouti à une diminution de la teneur spécifique en C-PC jusqu'à 10 mg/g_{MS}.

(2) Comparaison des procédés de production sur le milieu perméat de lait et le mélange de substrats perméat de lait et glycérol

Tableau 18. Bilan des performances finales des procédés de production en mixotrophie

Procédés de production en mixotrophie	PDL	PDL + Glycérol
Temps de culture (h)	284	450
MS finale (g/L)	23,56	25
r_{MS} (g/l/h)	**0,08**	**0,05**
Quantité totale de coproduit consommé (g)	130	102
Teneur intracellulaire en C-PC (mg/g_{MS})	7,93	11,3
$r_{C\text{-}PC}$ (mg/L/h)	**0,66**	**0,65**

La seule différence remarquable entre les deux procédés de production se trouve au niveau de la source de carbone du milieu de culture, le premier milieu de culture contenait 100% de PDL composé à 83% de lactose et le deuxième contenait un mélange PDL/glycérol (83% de PDL et 17% de glycérol). La concentration totale en carbone apportée à la souche microalgale reste similaire.
Le rendement de conversion des substrats en biomasse est légèrement différent entre le lactose et le glycérol où r_{MSL}=0,48 g_{MS}/g_L et r_{MSG} = 0,53 g_{MS}/g_G. La comparaison des performances de ces deux procédés permet de constater une durée de procédé de production presque deux fois plus longue sur le mélange de substrats. Cette augmentation du délai de production pour

atteindre la même quantité de MS est la conséquence des phases de latence observées entre chaque changement de métabolisme carboné (glycérol vers lactose). Le changement de substrat se traduit par des temps de latence au cours desquels la souche ne consomme pas de source de carbone et où la MS stagne ou diminue. La quantité de PDL totale consommée est inférieure de 28 g lors d'un procédé sur un mélange de substrat. En revanche la teneur intracellulaire en C-PC de la souche en fin de culture est deux fois plus importante lors du procédé de culture sur le mélange de substrats, ceci peut être due à une levée d'inhibition initiée par le glycérol ou peut être la conséquence d'une croissance ralentie et donc d'un taux de croissance global plus faible sur l'ensemble du procédé. La productivité finale en C-PC en mg/L/h est identique dans les deux procédés de production.

Étant donné que la souche *Galdieria sulphuraria* ne co-consomme pas le lactose et le glycérol tout procédé de production en mode Fed-batch ou chémostat utilisant une alimentation avec un mélange de substrat lactose et glycérol n'est pas envisageable, ce type de procédé aboutirait à l'accumulation du lactose dans le milieu et à une plus faible productivité en biomasse.

d) Culture Fed-Batch sur Perméat de lait et ajout de glycérol en fin de culture

Un procédé de production découplé en réalisant une première phase de culture sur un milieu PDL puis une seconde phase sur un milieu glycérol a été initié afin d'en évaluer les performances et les faisabilités techniques.

(1) Suivi du procédé de culture

Suite aux inconvénients rencontrés lors du procédé de production sur un mélange de substrats, le développement d'une culture associant les deux substrats mais l'un après l'autre a été opéré afin d'en connaître les performances. Le but étant de commencer la croissance sur un milieu PDL afin de monter en densité cellulaire tout en consommant le lactose des coproduits laitiers et de terminer la culture par un ajout de glycérol afin d'activer potentiellement la production de C-PC par les cellules de *G. sulphuraria*.

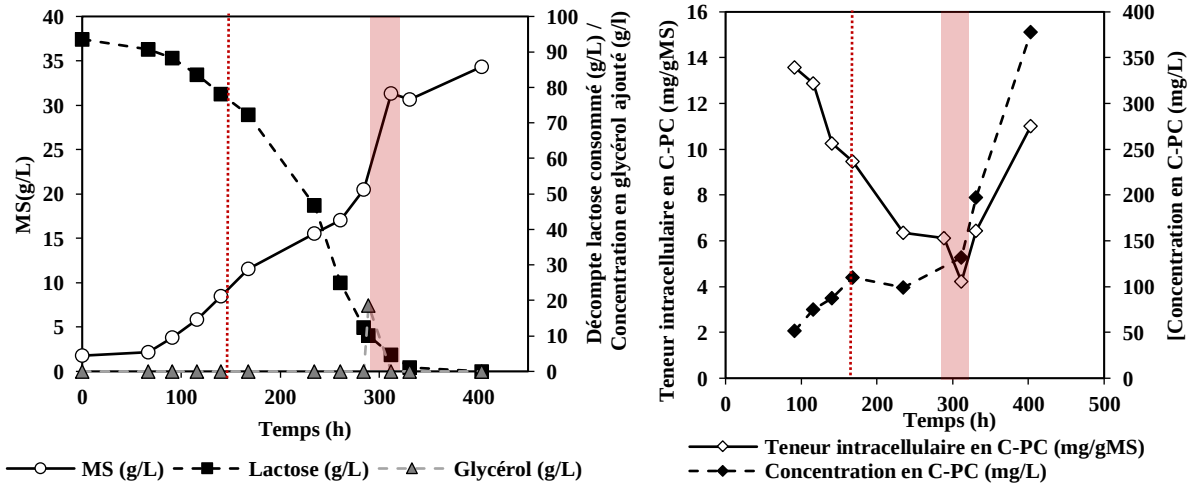


Figure 40. Culture Fed-Batch de la souche G. sulphuraria FCC3222 en mixotrophie sur un milieu PDL puis ajout de 20g/l de glycérol en fin de culture A) Suivi de la croissance et de la consommation en substrats B) Teneur intracellulaire et concentration global en C-PC. En rosé sont représentées les périodes de consommation du glycérol et la ligne discontinue rouge signale le début de la phase Fed-batch.

IV. Résultats

La première partie du procédé de production correspondant à la culture sur le milieu PDL est conforme aux résultats précédents (Partie IV-A-5-a). La souche a atteint 21 g/l de MS en 284h et le taux de croissance lors de la phase exponentielle était de 0,022h^{-1}.

L'ajout de 20 g/L de glycérol après 284h de culture a provoqué dans un premier temps une augmentation significative de la MS de plus de 10 g/l en 27 h, temps durant lequel la souche a consommé l'intégralité du glycérol ajouté. Cette période de consommation du glycérol s'est soldée par une baisse de la teneur intracellulaire en C-PC en passant de 6,13 mg/g_{MS} à 4,22 mg/g_{MS}. Suite à ce temps de production de biomasse et de consommation de glycérol, la concentration cellulaire a continué d'augmenter légèrement de manière inexpliquée jusqu'à 34 g/L et la concentration en C-PC a augmenté en passant de 132 mg/L à 377 mg/L due à l'augmentation de 7 mg/g_{MS} de la C-PC.

(2) Comparaison avec le procédé de culture sur le mélange de substrat

Tableau 19. Indicateurs de performances des différents procédés avec PDL

Procédés de production en mixotrophie	PDL	PDL + Glycérol	PDL puis Glycérol
Temps de culture (h)	284	450	403
MS finale (g/L)	23,56	25	34,3
r_{MS} (g/l/h)	**0,08**	**0,05**	**0,08**
Quantité totale de PDL consommé (g)	130	102	112
Protéines (g/100g)	34	33	33
Teneur intracellulaire finale C-PC (mg/gMS)	7,93	11,3	11
$r_{C\text{-}PC}$ (mg/L/h)	0,66	0,65	0,94
r_P (g/L/h)	0,027	0,016	0,027

La culture sur PDL suivi d'un ajout de glycérol a permis d'atteindre une productivité de C-PC 1,4 fois supérieure aux deux autres procédés sur milieu PDL seul tout en ayant la même teneur protéique intracellulaire.

Ce procédé est intéressant pour la productivité en C-PC mais reste moins consommateur de lactose donc de coproduit laitiers.

6. Procédé à haute densité cellulaire et effet d'une maturation

Au niveau industriel, les perméats de lait ou lactosérum sont concentrés par évaporation avant d'être séchés. Les concentrations en lactose économiquement optimale en terme de procédé et de transport des coproduits laitiers sont situées aux alentours de 300 g/L (De Glutz, 2009). Nous nous sommes donc placés à des concentrations similaires, pour simuler l'utilisation des perméats liquides concentrés.

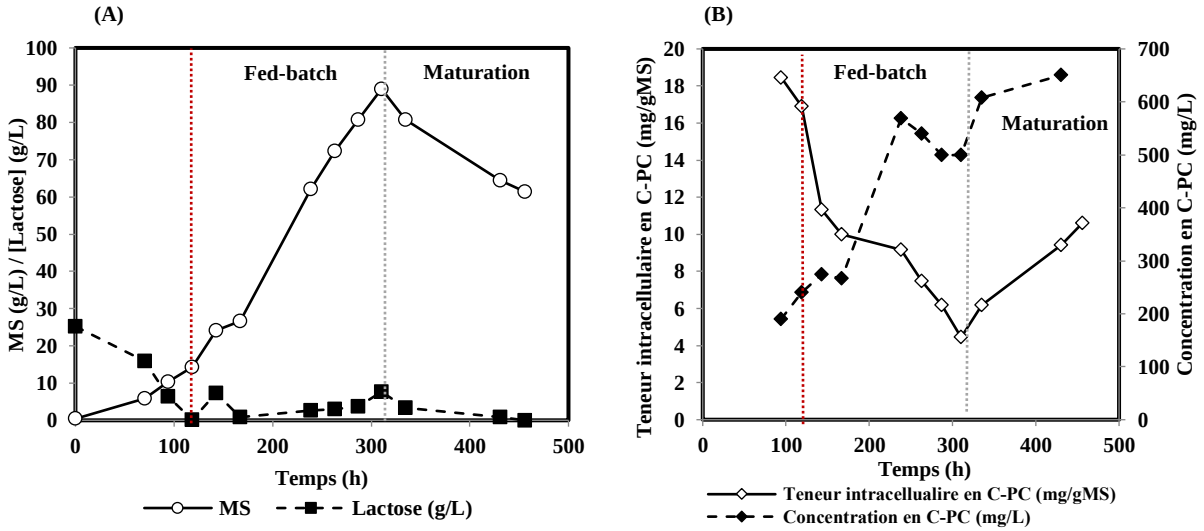


Figure 41. Culture Fed-batch de la souche FCC 3222 à forte densité cellulaire. A) Suivi de la croissance et de la consommation en lactose. B) Suivi de la teneur intracellulaire et de la concentration en C-PC. La ligne rouge discontinue marque le début de la phase Fed-batch et la ligne grise discontinue le début de la phase de maturation.

La MS atteinte en fin de phase batch était de 14 g/L au bout de 119 h de culture avec une concentration intracellulaire en C-PC de 17 mg/g_{MS}. La phase Fed-Batch a duré 192 h et correspond à un taux de croissance imposé de 0,015 h^{-1} et a permis d'atteindre 89 g/L de MS avec une concentration intracellulaire de 4,44 mg/g_{MS} de C-PC. La teneur intracellulaire en C-PC n'a fait que diminuer au cours de la phase Fed-Batch, comme observé précédemment (Partie IV-A-5-a). La concentration en C-PC produite dans le bioréacteur a augmenté malgré la baisse de la C-PC intracellulaire, cela peut s'expliquer par l'augmentation de la MS mais cette tendance s'inverse après 238 h lorsque la C-PC intracellulaire atteint de faible teneur et chute de 10,61 à 4 mg/g_{MS}. Les performances de croissance retrouvées au cours des phases Batch et Fed-Batch correspondent à celles initialement déterminées avec un milieu d'alimentation moins concentré en PDL, ceci correspond à notre stratégie d'alimentation imposant une limitation du métabolisme cellulaire par la source carbonée. Les MS atteintes au cours de ce procédé ont permis d'obtenir une productivité moyenne de biomasse r_{MS} à 1g/L/h et une consommation moyenne de lactose r_L à 3 g/L/h.

L'effet d'une phase dite de « maturation » a été testé lors de cet essai sur la biomasse. La phase de maturation consiste à arrêter l'alimentation en nutriment de la biomasse lorsque la densité cellulaire souhaitée est atteinte. La culture est maintenue dans cet état avec les mêmes paramètres de régulation pH, température et pO2 que lors de la croissance cellulaire. Cette phase de maturation provoquerait une réactivation de la production de certains pigments chez *Chlorella* (Segueilha et al., 2015).
La carence en nutriment au cours de la phase de maturation de 146 h a provoqué une baisse de la MS de 40% et parallèlement une augmentation de 60% de la teneur intracellulaire en C-PC. La concentration en C-PC a doublé au cours de cette phase de maturation.

IV. Résultats

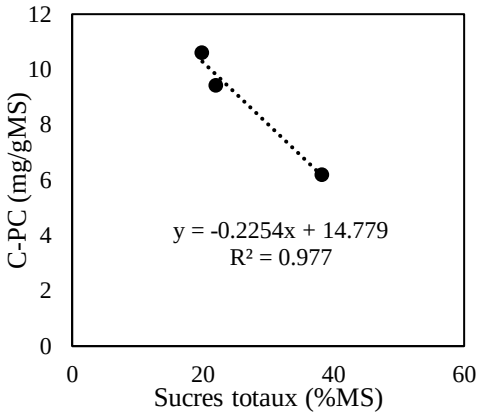


Figure 42. Corrélation de la teneur intracellulaire en C-PC en fonction du pourcentage de sucres totaux dans la biomasse

Tableau 20. Indicateurs de performance avant et après maturation

	Avant maturation	Après maturation
r_{MS} (g/L/h)	0,29	0,13
Teneur intracellulaire C-PC (mg/g_{MS})	4,44	10,61
$r_{C\text{-}PC}$ (mg/L/h)	1,61	1,43
Protéines (%MS)	31,2	45,06
r_P (g/L/h)	0,09	0,06
Sucres totaux (%MS)	38,29	19,93
r_{ST} (g/L/h)	0,11	0,03

La phase maturation a permis la multiplication par deux de la teneur intracellulaire en C-PC de la souche FCC3222 et a permis l'augmentation de 15% de la teneur intracellulaire en protéines. Cette phase a provoqué en parallèle une chute de la MS qui a considérablement influencé la productivité en molécules d'intérêts (C-PC et protéines) et a abouti à une diminution de la productivité totale en protéines et C-PC au cours de ce procédé de production.
Le suivi de la composition cellulaire de la souche FCC3222 au cours de la maturation a montré qu'il y a une corrélation linéaire (C-PC en fonction des sucres totaux R^2=0,977) entre la baisse de la teneur en sucres totaux et l'augmentation de la teneur intracellulaire de la C-PC (Fig. 42).

L'hypothèse d'une conversion des réserves en sucres vers la production de protéines est émise. Les sucres totaux de la souche *G. sulphuraria* sont essentiellement du glycogène (Martinez-Garcia et al., 2016), la souche serait alors capable d'hydrolyser celui-ci en glucose servant d'énergie pour la maintenance cellulaire et pour continuer d'alimenter le métabolisme protéique.

7. Développement d'un procédé de production en Chémostat sur milieu PDL

Les taux de croissance des souches de *G. sulphuraria* étant relativement faible pour un procédé de production en bioréacteur en comparaison avec les taux de croissance de levure sur lactose qui se situe entre 0,2h^{-1} et 0,3h^{-1}(Singh Yadav, 2014). Notre procédé est donc moins productif, ce qui pourrait être un frein d'un point de vue de la rentabilité économique du projet. C'est pour répondre à cette problématique que la mise au point d'un procédé de production en mode chémostat a été réalisée afin d'évaluer les performances de production en biomasse et C-PC sur ce type de procédé.

IV. Résultats

a) Chémostat avec un milieu d'alimentation PDL concentré à 100g/L

Un procédé de production en mode Chémostat de biomasse de *G. sulphuraria* a été mis au point afin d'évaluer les performances de cette souche dans le contexte d'une alimentation continue. Cette culture a été réalisée en mixotrophie avec les paramètres de culture similaires au mode Fed-batch : pH 3, agitation 1500 rpm, air 1 nl/min, 37°C, lumière blanche à 5000 µmol/m²/s.

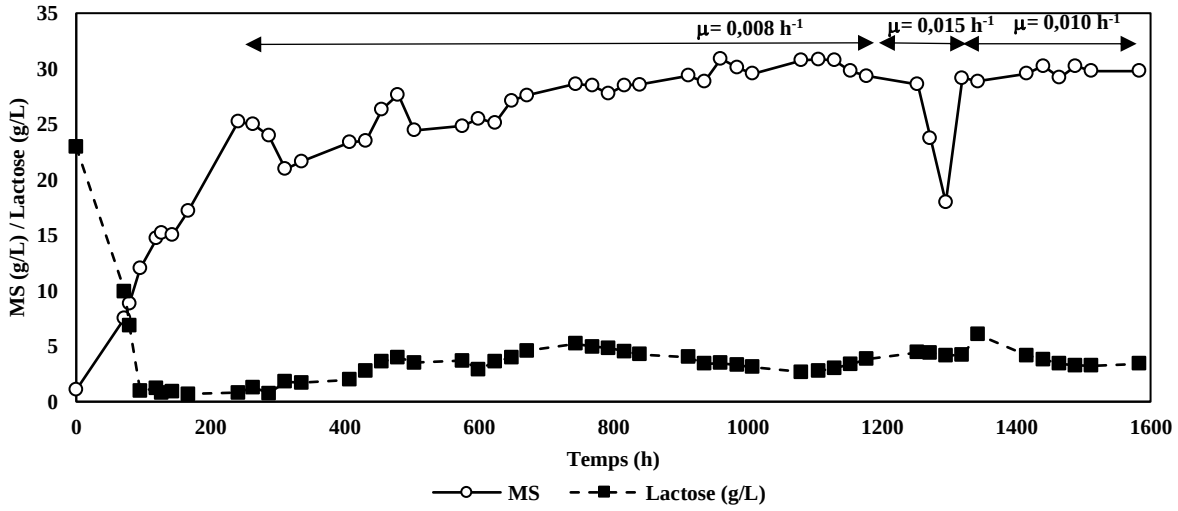


Figure 43. Culture de la souche FCC 3222 en chémostat sur un milieu perméat de lait

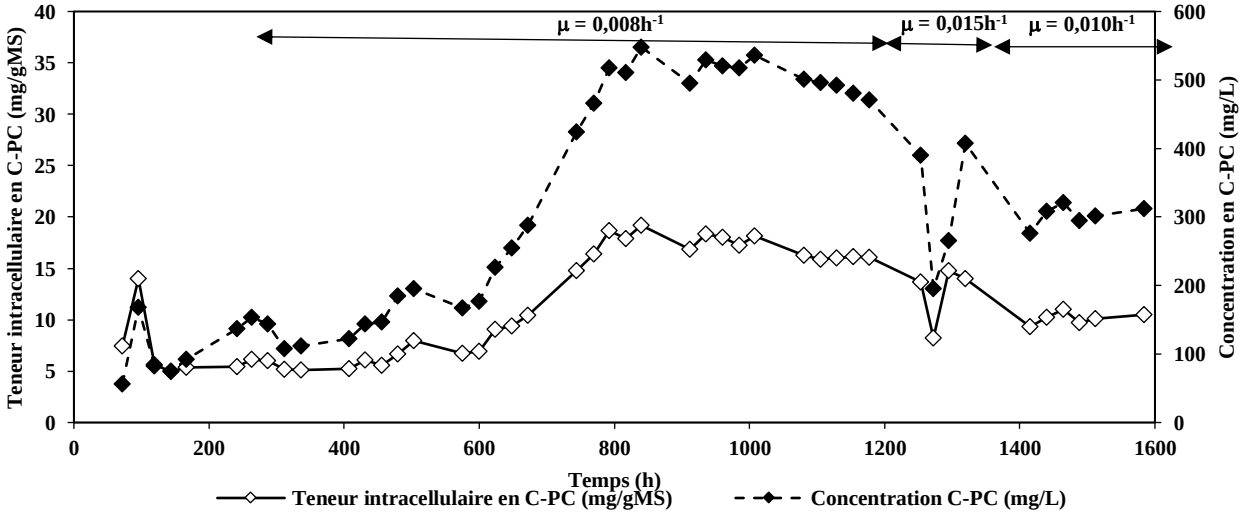


Figure 44. Évolution de la teneur intracellulaire et de la concentration en C-PC au cours de la culture en chémostat sur un milieu perméat de lait

La culture débute par une phase Batch permettant d'atteindre une concentration en biomasse de 25 g/L. L'alimentation en PDL concentrée à 100 g/L (83g/l de lactose) est apportée de manière exponentielle selon le taux de croissance μ=0,015h^{-1} lors de la phase Fed-Batch (de 143 h à 263 h). La solution d'alimentation pour le mode Chémostat a une concentration en PDL de 75 g/L ce qui correspond à 62 g/L de lactose. C'est à la fin de la phase Fed-Batch que la phase Chémostat commence avec un taux de croissance de 0,008 h^{-1}, ce qui correspond à 36% du taux de croissance moyen de la souche (0,022 h^{-1}). L'objectif en imposant un débit d'alimentation et donc un taux de croissance considérablement faible était de carencer la souche en substrat carboné afin d'observer l'effet de cette carence sur la production de protéines et de C-PC. La culture a mis 5 temps de séjours (625 h pour μ=0,008 h^{-1}) à se stabiliser et à atteindre un régime

permanent avec une MS comprise entre 28 g/L et 31 g/L et une teneur intracellulaire spécifique de C-PC de 16-17 mg/g_{MS}. Au terme de ces 5 temps de séjours, le taux de dilution de la culture est égal au taux de croissance.

Le taux de croissance à 0,008 h^{-1} a été maintenu au total durant 8 temps de séjours afin de pouvoir valider la tendance en MS et en production de C-PC. Ensuite, le débit d'alimentation a été augmenté ce qui a imposé un taux de croissance à 0,015 h^{-1} (68% du potentiel maximal anabolique µ/µmax). Seulement 24 h après le changement de débit, une dilution de la biomasse a été observée, ce qui a abouti à une dilution de la MS par 2 et de la teneur intracellulaire en C-PC (17 mg/g_{MS} à 8mg/g_{MS}) (Fig. 44). La concentration globale en C-PC a diminué de 60%, et une légère accumulation en lactose dans le milieu est mesurée (Fig. 43). Une réduction du débit d'alimentation a permis de stabiliser de nouveau le régime du bioréacteur en continu avec une masse sèche à 30 g/L.

Le taux de croissance imposé à 0,01 h^{-1} a permis d'obtenir une productivité de biomasse à 0,3 g/L/h avec une concentration intracellulaire de C-PC à 10 mg/g_{MS} deux fois plus faible que celle obtenue à un taux de croissance de 0,008 h^{-1}, donnant une productivité moyenne r_{MS} de 0,24 g/L/h. Au cours du régime permanent au taux de croissance de 0,01 h^{-1}, la biomasse est composée de 52,5% de protéines aboutissant à une productivité moyenne en protéines r_P de 0,126 g/L/h et $r_{C\text{-}PC}$ de 3 mg/L/h de C-PC.

Afin d'augmenter les productivités en biomasse au cours du procédé de production en mode Fed-batch, la stratégie a été d'augmenter la concentration finale en biomasse grâce à l'utilisation d'un PDL ayant une plus forte concentration (300 g/L de masse sèche et 250 g/L de lactose).

8. Amélioration continue d'un procédé de production

A cette étape du projet, la poursuite de l'amélioration des souches a permis de sélectionner des variants de *G. sulphuraria* ayant de meilleures performances de production en C-PC en hétérotrophie. Ces variants issus de la souche *G. sulphuraria* UTEX 2919 ont suivi les étapes de caractérisation et ceux ayant obtenu les meilleures performances de croissance et de productivité en molécules d'intérêt ont suivi le processus de développement de procédé en bioréacteurs Batch, Fed-Batch (données non présentées). La souche retenue pour le reste du développement du procédé en continu a donc été la souche FCC3432.

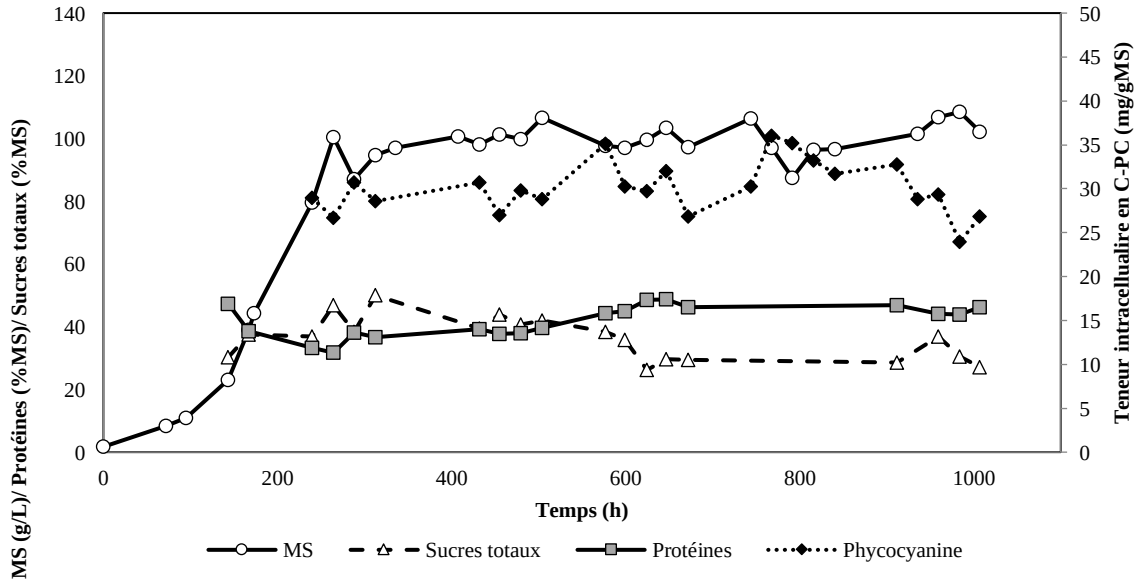


Figure 45. Culture en chémostat de la souche FCC3432 en hétérotrophie sur du milieu PDL.

IV. Résultats

Les indicateurs de croissance (μ, r_{MS}, r_L) de la souche FCC3432 sont identiques à ceux de la souche FCC3222. Celle-ci est capable de tenir un taux de croissance à 0,01 h^{-1} en Chémostat avec une biomasse à 100 g/L. La teneur intracellulaire en C-PC au cours du procédé en Chémostat est située entre 25-35 mg/g_{MS} en hétérotrophie ce qui est supérieur à la capacité de production en C-PC de la FCC3222 en mixotrophie pour un même taux de dilution (20 mg/gMS). La souche FCC3432 cultivée selon ce procédé de production a une productivité moyenne en biomasse r_{MS} de 1 g/L/h et de $r_{C\text{-}PC}$ de 25-35 mg/L/h.

La teneur intracellulaire en protéines au cours du régime permanent est située entre 45-50% de MS donnant une productivité moyenne r_P de 0,45-0,5 g/L/h et les sucres totaux variaient entre 20 et 35% de la MS (Fig. 45).

9. Procédé de production Fed-Batch à échelle pilote

Afin d'étudier la faisabilité industrielle de ce procédé de production, un transfert de procédé a été réalisé entre l'échelle laboratoire et l'échelle pilote. L'objectif de cette transposition était d'évaluer les capacités techniques et biologiques du procédé de production avec des outils industriels. Les étapes critiques lors d'une montée en échelle sont la préparation des milieux qui sont stérilisés en place par envoi de vapeur à cœur et les transferts de gaz qui sont modifiés de par la géométrie, le volume et l'agitation des bioréacteurs. De plus le pilotage d'un système à grande échelle intègre une variable régulatrice et ajustable qui est la pression, elle facilite le maintien de la stérilité et améliore le transfert d'oxygène.

Ce procédé de production a été réalisé dans un bioréacteur de 100L en mode Fed-batch avec les mêmes stratégies de pilotage « alimentation exponentielle » avec des paramètres de culture similaire aux cultures en bioréacteur de laboratoire pour la souche FCC3432. Le pH est régulé à 3, T° 42°C (optimisée Annexe. 1), la consigne pO2 est à 30%, l'air est ajusté à 50nl/min et la pression relative de 0,3bar. La régulation du pH a été faite par une solution alcaline NH_4OH de 14% et acide H_2SO_4 4N.

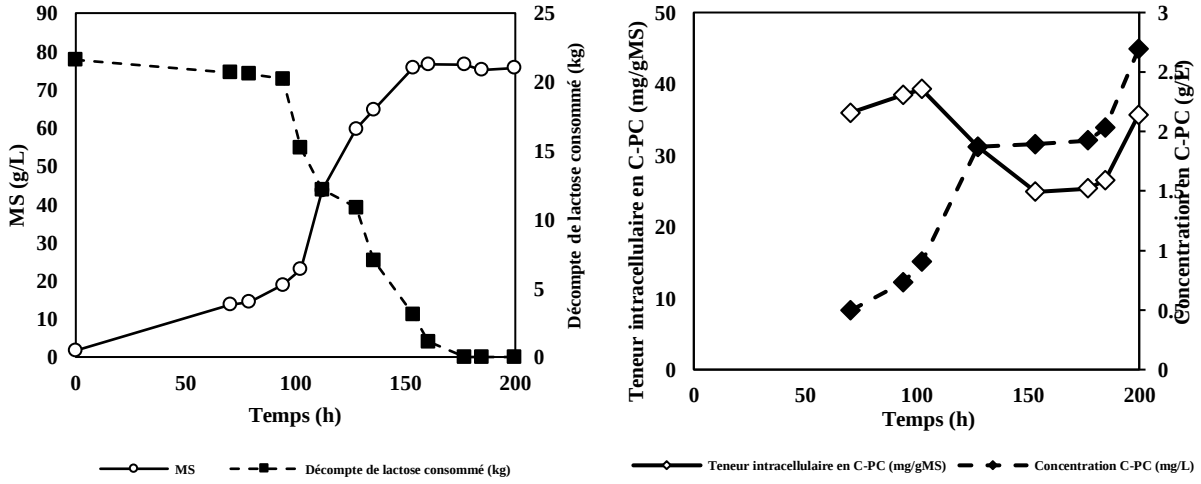


Figure 46. Culture de la souche FCC3432 en hétérotrophie en bioréacteur de 100L sur un milieu PDL.

Les indicateurs de performance obtenus lors de cet essai en bioréacteur de type industriel de 100 L ont été similaires à ceux obtenus en bioréacteur de laboratoire. Le taux de croissance au cours de la phase exponentielle de croissance est de 0,022 h^{-1}, celui-ci est imposé par le profil d'alimentation dimensionné pour limiter l'accumulation de lactose dans le milieu de culture et favoriser la production de C-PC pendant la croissance.

IV. Résultats

La stérilisation en place du milieu pied de cuve et d'alimentation Fed-batch en cuve inoxydable n'a pas eu d'impact sur la croissance de la souche FCC3432. Ce mode de stérilisation n'a pas modifié la biodisponibilité des éléments nutritifs du milieu.
La MS obtenue en fin de culture est 76 g/L, elle est composée de 35 mg/g_{MS} de C-PC et de 48%(g/g) de protéines.

Ces résultats sont comparables aux essais réalisés à l'échelle laboratoire dans des bioréacteurs de 2,5L, ce qui nous a permis de valider la montée en échelle de notre procédé de production sur PDL avec la souche FCC3432.

10. Conclusions intermédiaires spécifiques au procédé de production

Les différents essais présentés ci-dessus permettent de tirer un certain nombre de conclusions sur le pilotage du procédé de production de *G. sulphuraria* dans un environnement contenant un coproduit lacté.

Le cahier des charges de départ était de cultiver une souche de *G. sulphuraria* en bioréacteur dans un milieu de culture contenant du PDL et d'ajuster les paramètres de culture de manière à obtenir une croissance de la souche d'intérêt permettant d'aboutir à la consommation totale du lactose présent dans le milieu tout en produisant une biomasse valorisable (riche en protéines et C-PC) afin de pouvoir aboutir à une mise sur le marché alimentaire et nutraceutique de ce produit en fin de procédé.

Le PDL étant riche en lactose et minéraux, peu d'éléments nutritifs sont ajoutés à ce coproduit laitiers pour la culture de *G. sulphuraria* ce qui rend ce procédé de production facilement transposable à l'échelle industrielle. Pour la mise au point du procédé en bioréacteur la souche FCC3222 a été utilisé comme modèle en mixotrophie car l'apport de la lumière favorise la production de C-PC. La souche FCC 3222 est un variant de la souche sauvage UTEX2919 sélectionnée sur milieu PDL et est ainsi adapté à cet environnement de culture contenant du lactose, des minéraux (phosphate, calcium, potassium et sodium) et des protéines de lait résiduelles. Le pilotage du procédé de production accompagné d'une conduite d'alimentation précise en mode Fed-Batch a permis le développement d'une culture à haute densité cellulaire en utilisant une solution de PDL concentrée à 300 g/L tel que peuvent l'être les perméats de fromage. Ce procédé de production a abouti à la production de 90 g/L de biomasse sèche avec une productivité de 0,29 g/L/h de MS, 0,09 g/L/h de protéines et 1,27 g/L/h de C-PC.

Les performances de production ont été améliorées grâce à la mise en place du procédé de production en mode Chémostat. Grâce à ce mode de culture avec un taux de croissance de la biomasse de la souche FCC3222 stabilisé à 0,01 h^{-1}, la productivité en biomasse est passée à 0,3 g/L/h avec un rendement r_{MSL} de biomasse produite sur lactose consommé de 0,48 g/g et une productivité en protéine de 0,16 g/L/h et 3 mg/L/h de C-PC.

Les résultats obtenus sur les milieux de culture composés d'un mélange de substrat (glycérol-PDL) ont abouti à une augmentation de la durée du procédé de production et donc à une baisse de la productivité globale. En revanche la culture biphasée en commençant par une croissance sur PDL et suivie par l'ajout de glycérol a permis une augmentation de la productivité en C-PC (x1,42) par rapport à la culture sur PDL seul. Cette stratégie de culture reste une technique identifiée comme permettant d'augmenter la concentration intracellulaire en C-PC. Enfin l'ajout d'une phase de maturation permettrait d'augmenter la concentration en C-PC intracellulaire mais réduirait la productivité globale de ce pigment due à l'augmentation de la durée du procédé de production.

IV. Résultats

De nombreux constats et connaissances de l'espèce microbienne *G. sulphuraria* ont été tirés de ces expériences de développement de procédé. Cette souche a une réelle capacité d'adaptation à son environnement de culture et malgré cela les performances de croissance sur le milieu de culture PDL se sont avérées répétitives pour un même procédé de culture. La sélection de souches sur milieu solide a abouti à l'identification de la souche FCC3432 capable de produire une quantité importante de C-PC en hétérotrophie.

Le pilotage du procédé de production peut être adapté en fonction des caractéristiques du produit désiré en fin de culture. Pour une biomasse riche en C-PC, le procédé de production en Fed-batch ou Chémostat avec la souche FCC3432 est au moment de la rédaction de ce manuscrit celui qui obtient les meilleures performances. La productivité en masse sèche r_{MS} est de 1,05 g/L/h avec un rendement sur lactose r_{MSL} de 0,48 g/g, une productivité de protéines de 0,46g/L/h et C-PC et 30 mg/L/h respectivement. Pour un cahier des charges désirant obtenir une biomasse riche en protéines, le pilotage du procédé de production est similaire à celui optimisé pour la production de C-PC étant donné que le taux global de protéines augmente lors d'une limitation en source carbonée au détriment de la teneur en sucres totaux qui diminue. Pour une production de biomasse sans critère de composition cellulaire, la croissance peut être boostée en ne limitant pas l'apport de source carbonée lors du procédé de production.

B. Caractérisation du transport cellulaire de *G. sulphuraria*

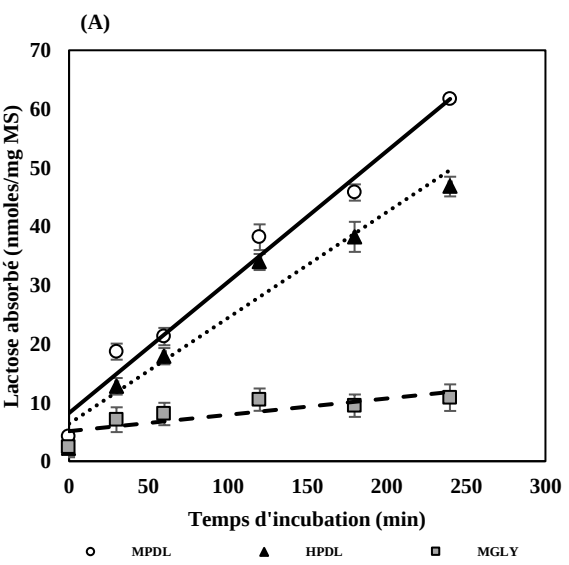
L'espèce microalguale *G. sulphuraria* est réputée pour sa capacité à consommer plus d'une trentaine de substrats carbonés différents (Gross and Schnarrenberger, 1995; Oesterhelt et al., 1999) mais aucune étude n'a mesuré la croissance sur un milieu contenant du lactose et n'a quantifié l'absorption de ce sucre chez les *cyanidiophyceae*.

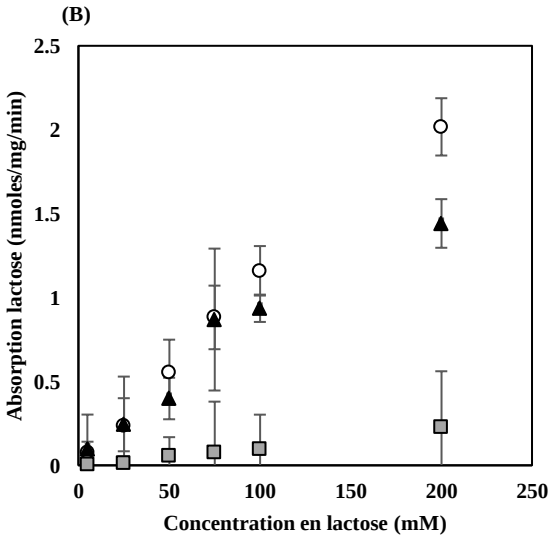
L'absorption cellulaire de glycérol ou de sucres radiomarqués (lactose, glucose, galactose) par *G. sulphuraria* a été analysée avec la souche FCC3222 en utilisant des suspensions cellulaires cultivées dans 4 conditions de culture différentes : soit en présence de glycérol en mixotrophie (MGLY) ou en hétérotrophie (HGLY), soit en présence de PDL en mixotrophie (MPDL) ou en hétérotrophie (HPDL).

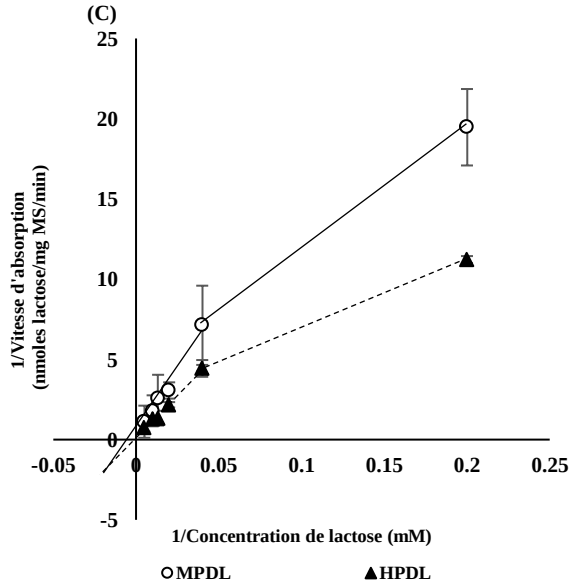
Dans un premier temps, nous avons comparé la croissance de la souche FCC3222, en hétérotrophie sur un milieu Glycérol et sur un milieu PDL en fonction de la nature du substrat carboné présent dans la pré-culture (Annexe 3). Comme nous l'avons déjà décrit la partie IV-A, l'ensemble de ces observations montrent que *G. sulphuraria* est capable de se développer en présence de glycérol et de lactose comme source de carbone. Toutefois, lors d'un changement de substrat carboné organique, dans le sens Glycérol vers Lactose, elle a besoin d'une phase d'acclimatation pour utiliser le lactose. Ce temps d'adaptation pourrait correspondre au temps nécessaire à l'induction d'une voie métabolique pour le lactose.

1. Étude de l'absorption du lactose

Pour caractériser le système de transport du lactose le suivi de l'absorption de lactose radiomarqué au ^{14}C (50 mM) par des suspensions de *G. sulphuraria* a été réalisé. Les cellules de la souche FCC3222 utilisées lors de ce travail ont été préalablement cultivées dans différentes conditions MPDL, MGLY ou HPDL.







(D)

Absorption du lactose	MPDL	HPDL	MGLY
Vmax (nmoles de gly /min/mg_{MS})	0,25 ± 0,65	0,36 ± 0,58	0,02 ± 0,46
Km (mM)	19,1 ± 0,85	15,48 ± 3,85	13,24 ± 2,48
Km/Vmax	77,15 ± 7,04	42,41 ± 0,54	705,29 ± 8

Absorption du lactose	MPDL	HPDL	MGLY
Vmax (nmoles de gly /min/mg_{MS})	1,91 ± 3,8	3,75 ± 0,28	1,11 ± 0,03
Km (mM)	254,21 ± 3,9	346,26 ± 8,8	969,7 ± 7,04
Km/Vmax	133,03 ± 11	92,28 ± 5,01	866,62 ± 7,6

Figure 47. Cinétique de l'absorption du lactose par les cellules de G. sulphuraria.

Trois types de suspensions cellulaires sont utilisées, des cellules cultivées sur PDL en mixotrophie (MPDL) ou hétérotrophie (HPDL) et sur glycérol en mixotrophie (MGLY).

A) *Quantité de lactose absorbé au cours du temps. Les cellules sont incubées 0, 30, 60, 120, 180 et 240min en présence de 50mM (17,1 g/L) de lactose radiomarqué dans le milieu de culture à pH 3 Trois essais différents avec des triplicats pour chaque condition.*

B) *Cinétique d'absorption du lactose en fonction de sa concentration dans le milieu. Les cellules sont incubées 60min en présence de 5 ; 25 ;50 ;75 ;100 et 200 mM de lactose radiomarqué dans le milieu de culture à pH3. Trois essais différents avec des triplicats pour chaque condition.*

C) *Transformation Lineweaver-Burk des données présentées en B.*

D) *Tableau des valeurs de cinétique d'absorption du lactose.*

Le suivi de l'absorption du lactose dans les cellules de FCC3222 au cours de 4 h d'incubation dans un milieu de culture contenant 50 mM de lactose (17,1 g/L de lactose) a permis de mettre en évidence une réelle différence entre les cellules cultivées sur lactose et celles cultivées sur

glycérol. Les cellules provenant d'une culture sur glycérol ont une vitesse d'absorption du lactose quasi nulle durant les 240 min d'incubation alors que les cellules habituées à consommer du lactose que ce soit en mixotrophie ou hétérotrophie (MPDL ou HPDL) montrent une absorption linéaire au cours du temps. (Fig. 47A). La cinétique d'absorption du lactose en fonction de sa concentration permet d'observer une augmentation significative de la vitesse d'absorption de manière proportionnelle à la concentration (MPDL et HPDL) avec des valeurs maximales à 200mM de 2,02 nmoles/mg_{MS}/min pour MPDL et 1,44 nmoles/mg_{MS}/min pour HPDL. La vitesse d'absorption de la condition MGLY n'augmente que très légèrement, la vitesse maximale d'absorption étant 0,23 nM/mg_{MS}/min observée à 200mM de lactose. Ces observations démontrent que seules les cellules adaptées à une culture sur du lactose ont la capacité d'absorber ce sucre ; ce qui explique l'absence de croissance des cellules en présence de lactose sans période d'acclimatation préalable (Annexe 3).

Pour les conditions MPDL et HPDL, aucune saturation significative de l'absorption n'est détectable malgré les fortes concentrations appliquées, ce qui suggère un système de transport du lactose non saturable. Toutefois, la représentation Lineweaver-Burk permet d'identifier deux tendances d'absorption du lactose, pouvant être la représentation de deux systèmes de transport. Les paramètres cinétiques d'absorption pour ces deux systèmes ont été déterminés malgré la non saturation de l'absorption afin d'obtenir des valeurs de cinétiques indicatives. Le premier système aurait une faible affinité pour le lactose avec un $K_{m(MPDL)}$ égal à 19,1 mM et un $K_{m(HPDL)}$ égal à 15,48 mM et des vitesses maximales d'absorption du lactose $V_{max(MPDL)}$ et $V_{max(HPDL)}$ égales à 0,25 et 0,36 nmoles/mg_{MS}/min, respectivement. Le second système de transport du lactose aurait une très faible affinité avec un $K_{M(MPDL)}$ égal à 254,21 mM et un $K_{M(HPDL)}$ égal à 346,26 mM et des vitesses maximales d'absorption du lactose $V_{max(MPDL)}$ et $V_{max(HPDL)}$ égales à 1,19 et 3,75 nmoles/mg_{MS}/min, respectivement (Fig. 47D). La transformation Lineweaver-Burk de la condition MGLY est représentée si dessous (Fig. 48) et a une échelle en ordonnée avec des valeurs 10 fois supérieures à celle du graphique correspondant aux condition MPDL et HPDL (Fig. 47C), la vitesse d'absorption du lactose dans cette condition semble extrêmement faible si ce n'est pas un artefact.

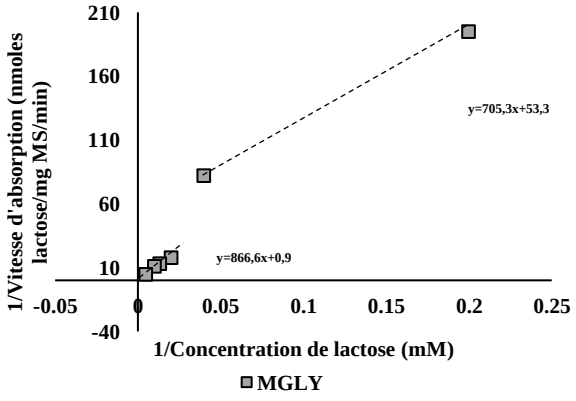
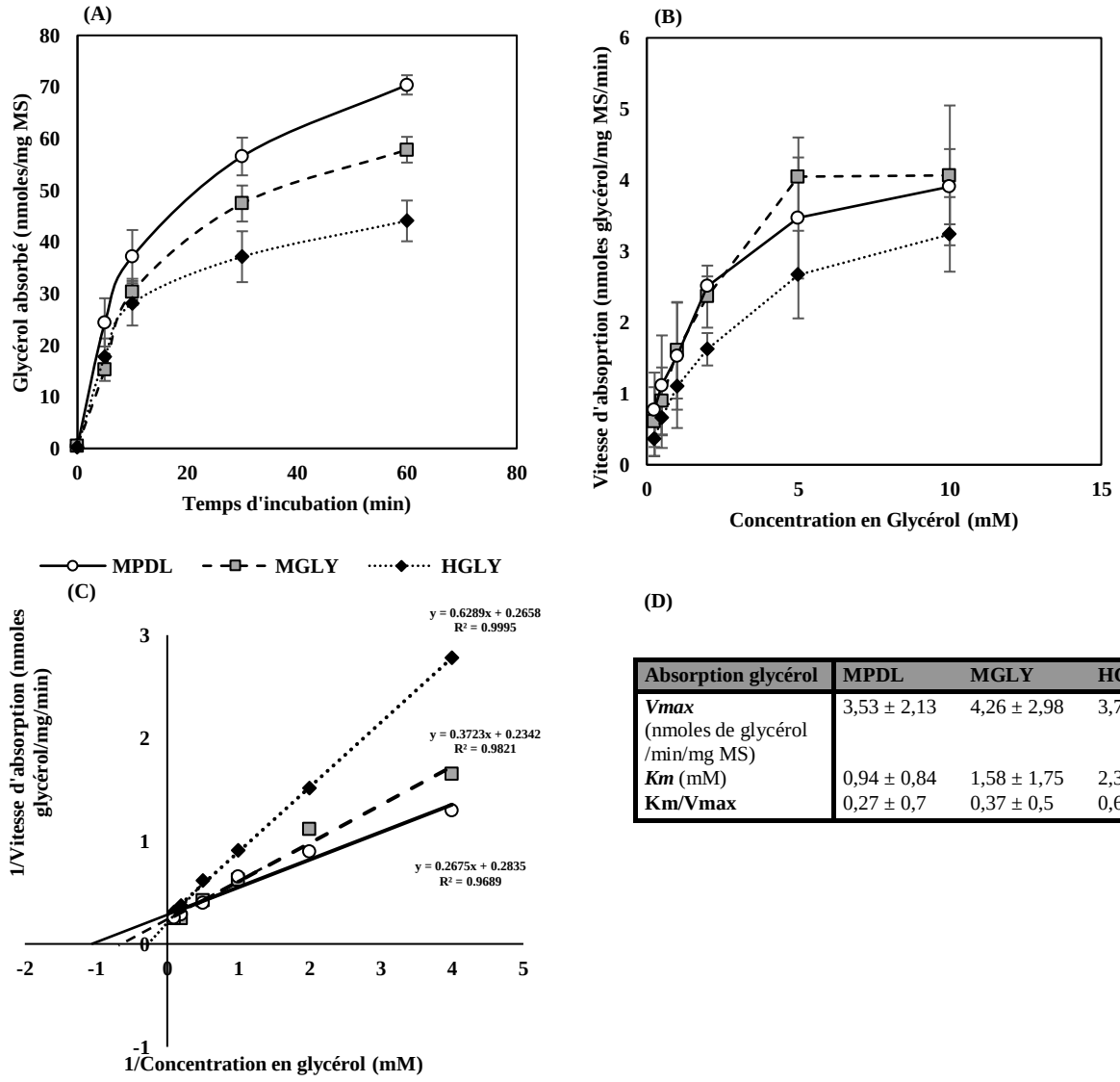


Figure 48. Cinétique d'absorption du lactose sur les cellules pré-cultivées sur glycérol en mixotrophie (MGLY) en fonction de sa concentration dans le milieu. Les cellules sont incubées 60 min en présence de 5 ; 25 ;50 ;75 ;100 et 200 mM de lactose radiomarqué dans le milieu de culture à pH 3. Trois essais différents avec des triplicats pour chaque condition.

Enfin, les cinétiques d'absorption observées pour les conditions MPDL et HPDL ne montrent pas de différences importantes, ce qui indique que le mode trophique (mixotrophie ou hétérotrophie) ne semble pas avoir d'impact significatif sur l'absorption du lactose.

2. Étude de l'absorption du glycérol

Pour caractériser le système de transport du glycérol dans les cellules de *G. sulphuraria*, l'absorption de glycérol radiomarqué au ^{14}C (1 mM) par la souche FCC3222 a été mesurée. Les suspensions cellulaires utilisées pour cette étude ont été cultivées en condition MGLY, HGLY ou MPDL.



(D)

Absorption glycérol	MPDL	MGLY	HGLY
Vmax (nmoles de glycérol /min/mg MS)	3,53 ± 2,13	4,26 ± 2,98	3,76 ± 1,04
Km (mM)	0,94 ± 0,84	1,58 ± 1,75	2,36 ± 0,87
Km/Vmax	0,27 ± 0,7	0,37 ± 0,5	0,62 ± 0,28

Figure 49. Cinétique de l'absorption du glycérol par les cellules de G. sulphuraria.

Trois types de suspensions cellulaires sont utilisées, des cellules cultivées sur glycérol en mixotrophie (MGLY), sur glycérol en hétérotrophie (HGLY) et sur PDL en mixotrophie (MPDL).

A) *Quantité de glycérol absorbé au cours du temps. Les cellules sont incubées 0, 5, 10, 30 et 60 min en présence de 1 mM (0,092 g/L) de glycérol radiomarqué dans le milieu de culture à pH 3. Trois essais différents avec des triplicats pour chaque condition.*

B) *Cinétique d'absorption du glycérol en fonction de sa concentration dans le milieu. Les cellules sont incubées 5min en présence de 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 5 et 10 mM de glycérol radiomarqué dans le milieu de culture à pH3. Trois essais différents avec des triplicats pour chaque condition.*

C) *Transformation Lineweaver-Burk des données présentées en B.*

D) *Tableau des valeurs de cinétique d'absorption du glycérol.*

IV. Résultats

En calculant la quantité de glycérol absorbée par minute, nous avons constaté que la vitesse d'absorption du glycérol (1 mM) n'est significativement pas différente entre les 3 conditions au cours des dix premières minutes (en moyenne 3,5 nmoles/mg_{MS}/min). Après 10 minutes d'incubation, la vitesse d'absorption diminue pour l'ensemble des conditions (MGLY = 0,96 nmoles/mg_{MS}/min ; HGLY = 0,73 nmoles/mg_{MS}/min et MPDL = 1,17 nmoles/mg_{MS}/min après 60 min d'incubation). Durant cette seconde phase, les souches préalablement cultivées en mixotrophie (MPDL et MGLY) absorbent une quantité supérieure de glycérol que les cellules cultivées en condition hétérotrophe (HGLY). La quantité totale de glycérol absorbé est significativement supérieure pour la condition MPDL avec 70,41 nmoles/mg_{MS} absorbées en 1 h d'incubation alors que la condition MGLY absorbe 57,86 nmoles/mg_{MS} et la condition HGLY 44,07 nmoles/mg_{MS}. Les conditions MGLY et MPDL sont significativement différentes de la condition HGLY après 10min d'incubation mais la différence d'absorption existante entre MPDL et MGLY n'est pas significative (*p. value* <0,05) (Fig. 49A).

La vitesse d'absorption en fonction de la concentration en glycérol suit une courbe monophasique de Michaelis-Menten, ce qui reflète une saturation du système de transport. Les paramètres cinétiques d'absorption ont pu être calculés, les $K_{m(MPDL)}$, $K_{m(MGLY)}$ et $K_{m(HGLY)}$ sont respectivement 0,94 mM, 1,58 mM et 2,36 mM et les vitesses maximales d'absorption du glycérol $V_{max\ (MPDL)}$, $V_{max\ (MGLY)}$ et $V_{max\ (HGLY)}$ sont respectivement de 3,53 ; 4,26 et 3,76 nmoles/mg_{MS}/min. Après la transformation Lineweaver Burk les valeurs ont été reliées par régression linéaire, suggérant le fonctionnement d'un seul système de transport à haute affinité pour le glycérol (Fig. 49 C).

Les résultats obtenus permettent d'affirmer qu'aucune différence significative n'existe entre les paramètres de cinétiques de l'absorption du glycérol pour les différentes suspensions cellulaires (Tab. 21).

Tableau 21. Test de student entre les cinétiques d'absorption du glycérol pour les différentes conditions

p. value	**MPDL/MGLY**	**MPDL/HLGY**	**MGLY/HGLY**
Vmax	0,23	0,26	0,24
Km	0,26	0,21	0,39
Km/Vmax	0,27	0,30	0,12

La saturation du système de transport du glycérol indique la présence d'une protéine membranaire qui peut être responsable soit d'un transport passif (diffusion facilitée) soit d'un transport actif.

3. Étude de l'absorption du glucose et du galactose

Le lactose étant composé d'une molécule de galactose et d'une molécule de glucose, nous avons mesuré l'absorption cellulaire de ces deux hexoses pour déterminer d'éventuelles corrélations entre les systèmes de transport pour ces hexoses et celui du lactose.

a) Culture sur un mélange glucose-galactose

Un suivi de croissance et de consommation des sucres a été réalisé pour la souche FCC3222 cultivée sur le milieu de culture de *G. sulphuraria* contant 15 g/L de glucose et 15g/L de galactose à la place de 30 g/L de lactose. L'objectif était d'observer la préférence ou non d'un substrat carboné organique par rapport à l'autre lors d'une culture sur un mélange de sucres.

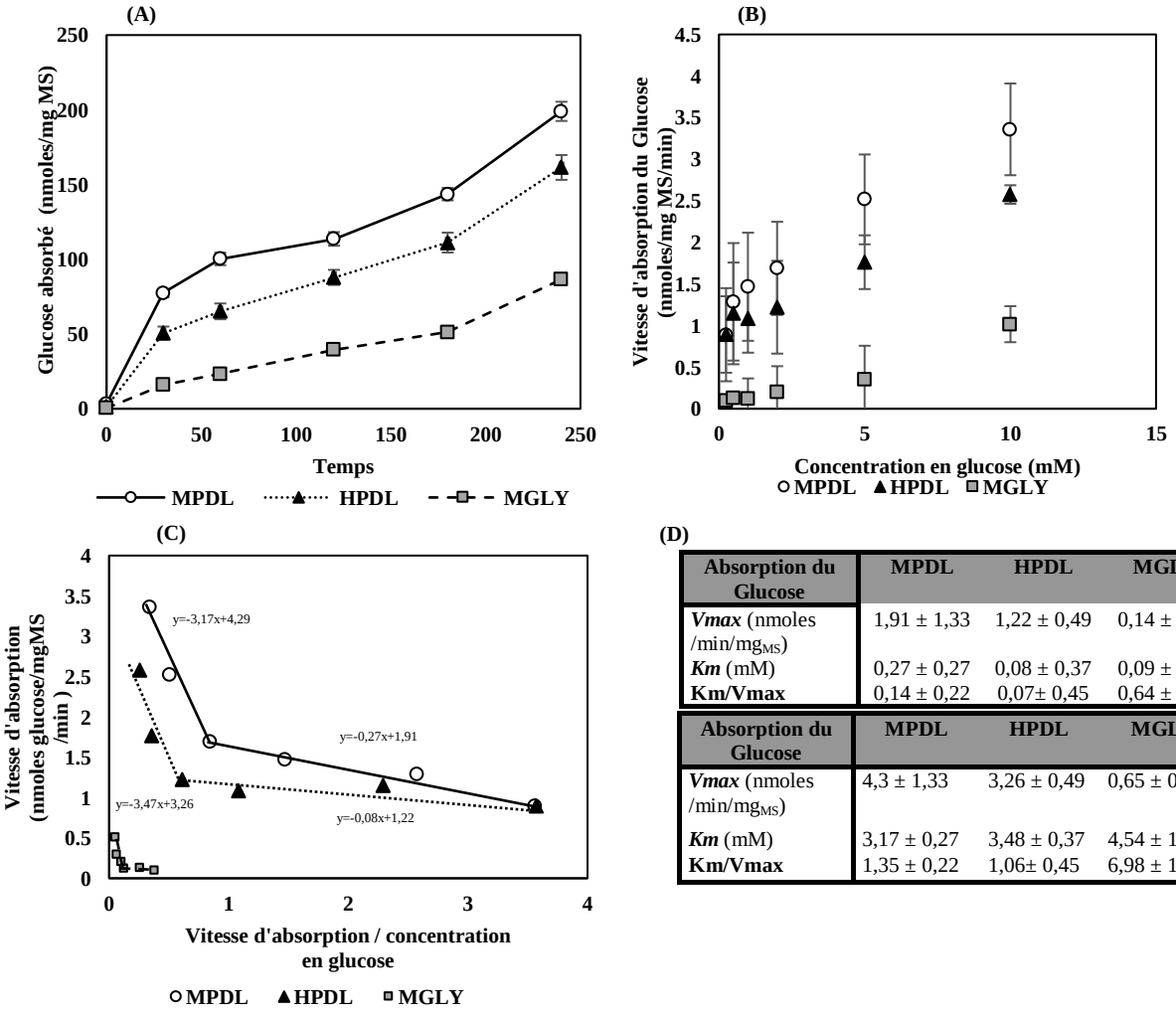
Le suivi de consommation des sucres par HPLC a montré une co-consommation de ces deux substrats avec un taux de consommation similaire à 0,3 g/L/h en phase exponentielle de croissance (Annexe 4). Ce résultat est en accord avec la publication d'Oesterhelt,

Schnarrenberger, et Gross 1999 qui détermine un temps de génération similaire de la souche *G. sulphuraria* sur un milieu contenant du D-Glucose ou du D-Galactose.

Cet essai montre que le glucose et le galactose peuvent être utilisés par *G. sulphuraria* comme source de carbone. Bien qu'il n'apporte pas d'élément supplémentaire sur le système de transport du lactose, l'hypothèse d'une hydrolyse du lactose au niveau de la membrane et d'une consommation immédiate du glucose et galactose reste envisageable.

b) Étude de l'absorption du glucose

Afin de pouvoir comparer la cinétique de transport du glucose avec celle du lactose, le suivi de l'absorption du glucose a été réalisé selon les mêmes conditions de culture et les mêmes temps d'absorption.



(D)

Absorption du Glucose	MPDL	HPDL	MGLY
Vmax (nmoles /min/mg_{MS})	1,91 ± 1,33	1,22 ± 0,49	0,14 ± 0,49
Km (mM)	0,27 ± 0,27	0,08 ± 0,37	0,09 ± 0,50
Km/Vmax	0,14 ± 0,22	0,07± 0,45	0,64 ± 0,51

Absorption du Glucose	MPDL	HPDL	MGLY
Vmax (nmoles /min/mg_{MS})	4,3 ± 1,33	3,26 ± 0,49	0,65 ± 0,55
Km (mM)	3,17 ± 0,27	3,48 ± 0,37	4,54 ± 1,1
Km/Vmax	1,35 ± 0,22	1,06± 0,45	6,98 ± 1,7

Figure 50. Cinétique de l'absorption du glucose dans les cellules de G. sulphuraria.

Trois types de suspensions cellulaires sont utilisées, des cellules cultivées sur PDL en mixotrophie (MPDL) et hétérotrophie (HPDL) et sur glycérol en mixotrophie (MGLY).

A) *Quantité de glucose absorbé au cours du temps. Les cellules sont incubées 0, 30, 60, 120, 180 et 240 min en présence de 50mM (9 g/L) de glucose radiomarqué dans le milieu de culture à pH 3. Deux essais différents avec des triplicats pour chaque condition.*

B) *Cinétique d'absorption du lactose en fonction de sa concentration dans le milieu. Les cellules sont incubées 5min en présence de 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 5 et 10 mM de glucose radiomarqué dans du milieu de culture à pH 3. Deux essais différents avec des triplicats pour chaque condition.*

C) *Transformation Eadie-Hofsee des données présentées en B.*

D) *Tableau des valeurs de cinétique d'absorption du glucose.*

Les quantités de glucose absorbées au cours du temps dans les cellules initialement cultivées sur PDL (MPDL et HPDL) sont statistiquement différentes entre les conditions.

Tableau 22. Test de student entre les cinétiques d'absorption du glucose entre les différentes conditions

	p. value		
Temps	**MPDL/HPDL**	**MPDL/MGLY**	**HPDL/MGLY**
0 min	0,216	0,136	0,130
30 min	0,004	0,001	0,028
60 min	0,001	0,004	0,036
120 min	0,014	0,013	0,046
180 min	0,010	0,007	0,036
240 min	0,004	0,022	0,040

Les cellules pré-cultivées sur glycérol absorbent 2 à 3 fois moins de glucose que les cellules pré-cultivées sur PDL (Fig. 50A). La vitesse d'absorption du glucose par la condition MGLY est inférieure à 0,35 nmoles/mg_{MS}/min pour les concentrations de 0,25 à 5 mM de glucose puis 1 nmoles/mg_{MS}/min en présence de 10 mM de glucose. Pour les conditions MPDL et HPDL, les cellules montrent une absorption proportionnelle à la concentration en glucose allant de 1 à 2,57 nmoles/mg_{MS}/min (Fig. 50B, C). La représentation Eadie-Hofsee indique clairement l'implication de deux systèmes de transport de glucose ayant des propriétés cinétiques distinctes. Un système à haute affinité pour le glucose (déterminer avec des concentrations de 0,25 mM à 1 mM) avec un $K_{m(MPDL)}$ égal à 0,2 mM et un $K_{m(HPDL)}$ égal à 0,08 mM et une vitesse maximale de 1,91 et 1,22 nmoles/mg_{MS}/min, et un second système d'absorption ayant une plus faible affinité (déterminée avec des concentrations de 2 mM à 10 mM) avec les paramètres cinétiques suivants : $K_{m(MPDL)}$ égal à 3,17 mM et un $K_{M(HPDL)}$ égal à 3,48 mM et des *Vmax* égales à 4,3 et 3,26 nmoles/mg_{MS}/min (Fig. 50D).

c) Cinétique d'absorption du galactose

La cinétique d'absorption du galactose a été réalisée selon les mêmes paramètres de culture que ceux utilisés pour la cinétique d'absorption du lactose.

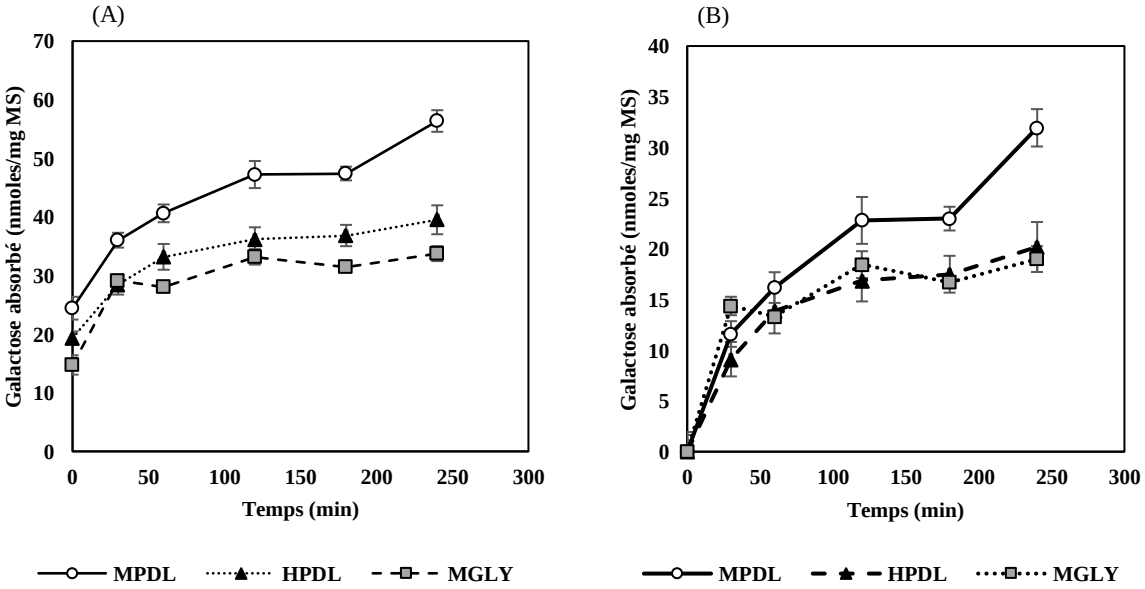


Figure 51. Cinétique d'absorption du galactose au cours du temps. Les cellules sont incubées 0, 30, 60, 120, 180 et 240 min en présence de 50 mM de galactose radiomarqué dans du milieu de culture à pH3. A) Quantités de galactose absorbées au cours du temps B) Soustraction de la quantité absorbée à T0. Deux essais différents avec des triplicats pour chaque condition.

IV. Résultats

L'étude du suivi de l'absorption du galactose ne permet pas de quantifier une absorption précise du galactose étant donné que l'absorption au temps T0 n'est pas nulle et que la quantité de galactose absorbée entre 0 et 240 min est relativement faible entre 15 et 30 nmoles/mg_{MS}. La quantité de galactose absorbée au temps 0 pourrait être considérée comme un bruit de fond et lorsque celle-ci est retirée aux autres valeurs (Fig. 51B) les trois conditions de culture semble avoir une cinétique d'absorption similaire avec une vitesse d'absorption moyenne de 0,13 nmoles/mg_{MS}/min pour la condition MPDL et de 0,08 nmoles/mg_{MS}/min pour les conditions HPDL et MGLY.

4. Caractérisation des mécanismes de transport

a) Effet du CCCP

Pour déterminer si les systèmes de transport de sucres sont dépendants du gradient de proton généré par l'activité d'une ATPase pompe à protons (co-transporteurs H^+/sucres), l'absorption des différents substrats carbonés organiques (glycérol, lactose et glucose) a été mesurée en présence de CCCP (carbonyl cyanide m-chloro-phenyl hydrazone), un agent découplant. Cette absorption a été réalisée avec des suspensions cellulaires issues de culture sur PDL en mixotrophie, condition pour laquelle nous avons observé les meilleures absorptions de sucres.

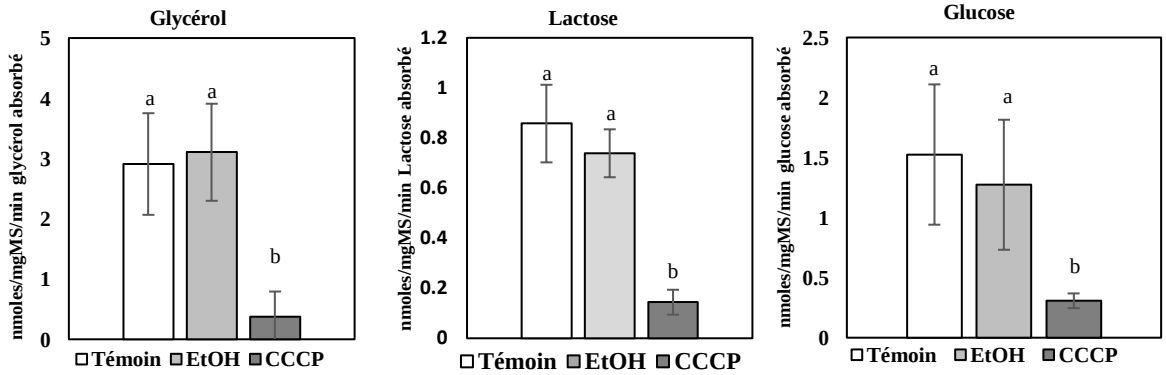


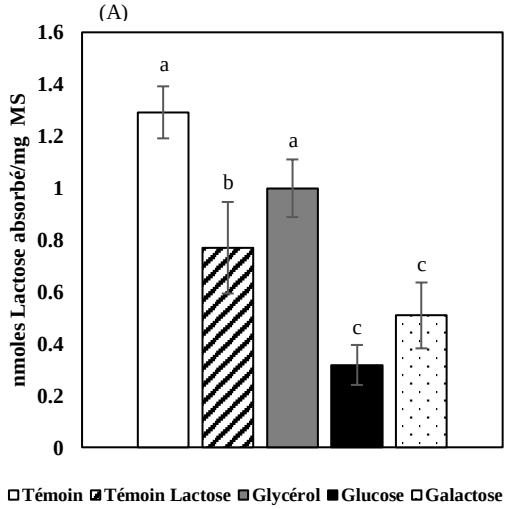
Figure 52. Effet du CCCP (10 µM) sur le transport de glycérol (1mM), de lactose (50mM) et de glucose (1mM) sur des suspensions cellulaires issues d'une culture sur PDL en mixotrophie Temps d'absorption de 60 min pour le lactose et 5 min pour le glycérol et glucose. Essai en triplicat. P.value <0,05.

La présence de CCCP 10µM dans le milieu d'incubation inhibe l'absorption du glycérol de 87,3%, celle du lactose de 83% et celle du glucose de 79,7% par rapport à la condition contrôle. L'éthanol présent dans la solution de CCCP n'a aucun impact significatif sur l'absorption des sucres. L'effet répressif du CCCP sur l'absorption du lactose, du glycérol et du glucose suggère fortement l'implication de co-transporteurs avec des H^+, pour chacun de ces trois substrats.

b) Spécificité du mécanisme de transport du lactose

Un essai de compétition impliquant les différents sucres étudiés caractérisés a été mis en œuvre afin de déterminer la spécificité du mécanisme de transport du lactose chez *G. sulphuraria.*

(A)



(B)

	Inhibition de 14C-lactose %
Témoin	0
Lactose	40,42
Glycérol	22,66
Glucose	75,41
Galactose	60,63

Figure 53. Effet de différents sucres sur l'absorption du lactose. A) Quantité de lactose absorbé par la souche FCC3222 pré-cultivée sur PDL dans un milieu d'incubation à 50 mM de lactose pendant 60 min en présence d'une concentration 10 fois supérieure d'autres substrats organiques (500 mM). B) Pourcentage d'inhibition de l'absorption de lactose en présence d'autres substrats organiques. p. value <0,05. Essai en triplicat.

Un essai de compétition consiste à mesurer l'absorption d'un substrat d'intérêt en présence d'un autre substrat appelé compétiteur présent dans le milieu d'incubation à une concentration 10 fois supérieure au substrat d'intérêt. La présence de glycérol en tant que substrat compétiteur provoque une faible diminution (seulement 22,66%) de l'absorption du ^{14}C-lactose qui n'est pas significativement différente à celle de la condition contrôle. Ce résultat suggère que le glycérol est transporté par un système de transport différent de celui du lactose. A l'inverse, l'absorption du lactose est réduite de 40,42% en présence d'une quantité excessive de lactose dans le milieu d'incubation. De façon surprenante, la présence de galactose ou de glucose en tant que sucre compétiteur génère une inhibition du transport de lactose plus importante que celle observée pour le lactose, 60,63% et 75,41% respectivement. Le fait que l'inhibition par le glucose et le galactose soit plus forte que celle observée par le lactose suggère que ces trois sucres pourraient être transportés par un seul transporteur ou système de transporteurs qui possèderaient une plus forte affinité pour le glucose et le galactose que pour le lactose.

Afin, d'essayer d'identifier le ou les transporteurs capables de catalyser le transport de lactose à travers la membrane plasmique, nous avons décidé de réaliser une étude d'expression différentielle des gènes des cellules de *G. sulphuraria* cultivées sur milieu PDL et sur glycérol.

5. Conclusions sur le transport du glycérol et du lactose par *G. sulphuraria*

Les essais réalisés sur le transport cellulaire nous ont permis de caractériser l'absorption du lactose, du glycérol et du glucose et d'initier la caractérisation de l'absorption du galactose. Cette étude avait pour objectif de comprendre le fonctionnement du métabolisme carboné et les interactions pouvant exister lors de l'absorption de ces sucres par la souche *G. sulphuraria*. L'identification d'un temps de latence nécessaire à la souche lors du passage sur un milieu contenant du PDL (Lactose) nous a rapidement laissé penser à un temps d'induction du métabolisme du lactose. Cette induction nécessaire entre le métabolisme du glycérol et celui du lactose a été remarquée lors du procédé de culture en bioréacteur sur un mélange glycérol-PDL par la présence d'un temps de latence entre la consommation du glycérol et du lactose.

Les paramètres cinétiques de transport du lactose ont été calculés, malgré la non saturation du système de transport dans les conditions étudiées afin d'évaluer les tendances d'absorption de ce substrat dans les cellules de *G. sulphuraria*. Deux systèmes de transport du lactose pourraient exister chez cette espèce avec un premier système ayant une affinité identique que les cellules soient induites au lactose ou pas *Km* = 13-19 mM mais ayant une vitesse d'absorption 10 à 20 fois supérieures pour les cellules induites au lactose ($Vmax_{(MPDL)}$ = 0,25nmoles/mg_{MS}/min et $Vmax_{(HPDL)}$ = 0,36nmoles/mg_{MS}/min). Le second système d'absorption s'il existe serait de très faible affinité *Km* >250mM avec une *Vmax* similaire quelles que soient les conditions de culture des cellules.
Les cinétiques de transport du glycérol sont statistiquement identiques avec une *Vmax* comprise entre 3,5 et 4,26 et une affinité *Km* de 0,94 à 2,36 mM. Deux systèmes de transport du glucose existeraient également, un premier système de forte affinité avec un *Km* compris entre 0,25 mM et 1 mM pour l'ensemble des conditions de culture, sur ce système les cellules non induites au lactose auraient une vitesse d'absorption *Vmax* 8 à 13 fois inférieure aux cellules induites. Le second système de transport serait de plus faible affinité avec une affinité comprise entre 3,48 et 4,2 mM pour l'ensemble des conditions.
Le système de transport du galactose reste à caractériser plus précisément.

Les différents systèmes de transport pour les sucres étudiés semblent dépendants du gradient électrochimique de protons et pourraient être des co-transports sucre/H+. L'essai de compétition suggère que le glycérol ne semble pas être transporté par le même système de transport que le lactose. A l'inverse, un seul système de transport pourrait transporter le lactose, le glucose et le galactose étant donné que les deux hexoses ont provoqué la réduction de l'absorption du lactose.

Afin, d'essayer d'identifier le ou les transporteurs responsables du transport du lactose et du glycérol à travers la membrane plasmique, nous avons décidé de réaliser une étude d'expression différentielle des gènes de cellules de *G. sulphuraria* cultivées sur milieu PDL et sur glycérol.

C. Étude de l'expression des gènes (RNAseq)

L'objectif de cette étude est d'observer la variation de l'expression des gènes en fonction des conditions de culture et plus particulièrement en fonction du substrat organique et du mode trophique utilisé lors des cultures de *G. sulphuraria.* La souche sauvage UTEX2919 a fini par s'adapter à l'obscurité et à croître sur un milieu PDL grâce aux repiquages successifs en milieu liquide. La souche sauvage UTEX2919 et la variante FCC3432 ont été utilisées pour l'étude RNAseq. La comparaison deux à deux des conditions de culture de la souche sauvage UTEX2919 en hétérotrophie et mixotrophie a pour but d'isoler les gènes exprimés ou réprimés

en présence de lumière. En mettant en parallèle les cultures de la UTEX2919 sur un milieu Glycérol ou PDL la finalité était de repérer les gènes différentiellement exprimés en fonction du substrat, tel que des transporteurs ou des enzymes du système carboné. Enfin en opposant l'expression des gènes de la souche UTEX2919 et ceux de la souche variante FCC3432 sur un milieu de culture similaire contenant du PDL, l'objectif était d'identifier des gènes impliqués dans la production de C-PC en hétérotrophie et d'observer les dérégulations obtenues entre la souche sauvage et le variant.

1. Travaux préliminaires à l'étude différentielle

a) Standardisation des conditions de culture

Pour chaque condition étudiée, la souche microalgale a été cultivée selon un mode de culture en Chémostat avec les mêmes paramètres de culture (37°C, pH 3, agitation à 1500 rpm, 1 nl/min d'air) et en présence d'une contre-pâle lumineuse blanche pour la condition en mixotrophie. Les conditions de culture utilisées sont celles qui avaient été déterminées comme optimales au moment de l'essai. Pour les quatre conditions, le régime permanant du Chémostat est atteint avec un taux de croissance imposé de 0,01 h^{-1} et une MS aux alentours de 100 g/L.

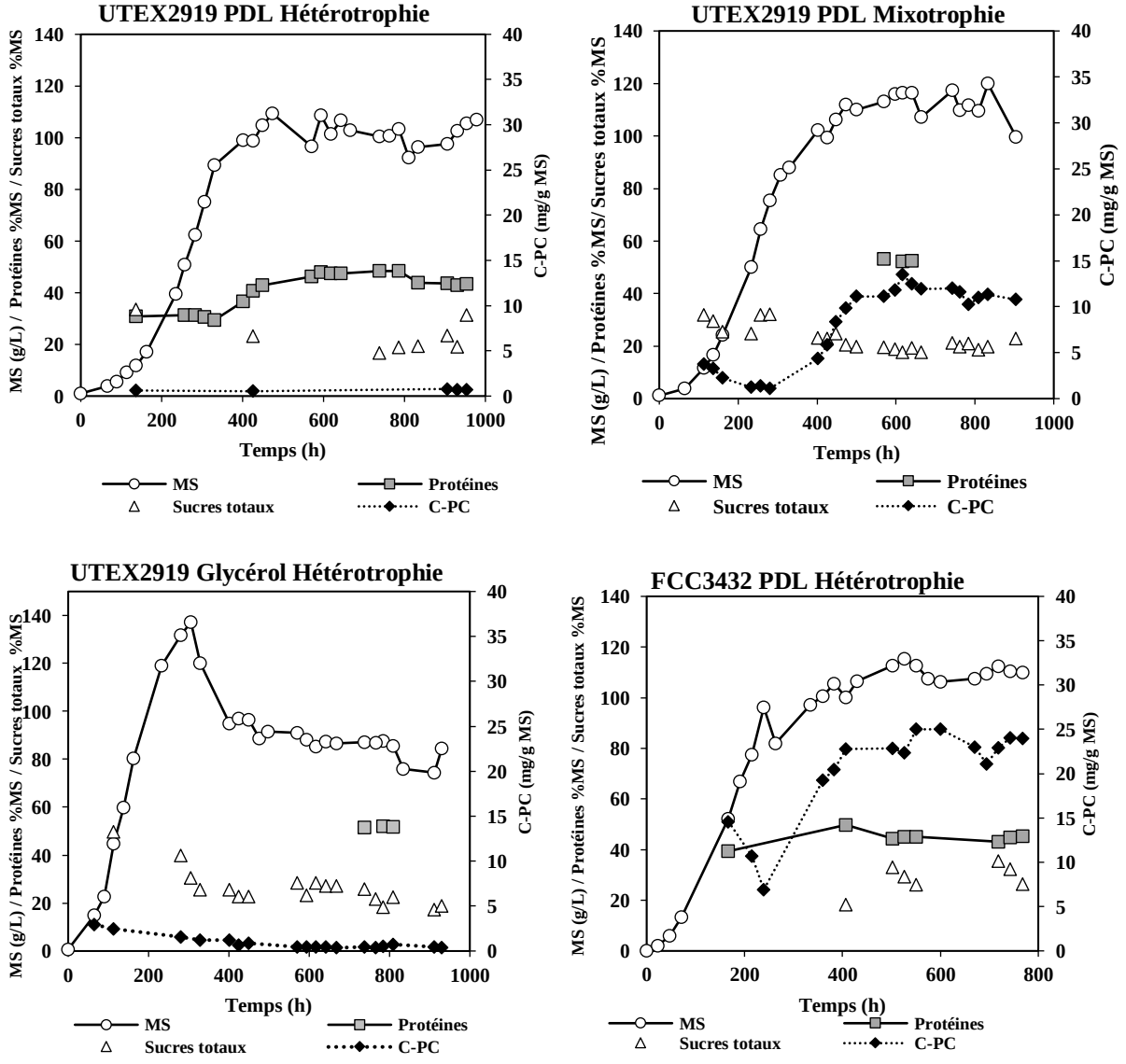


Figure 54. Suivi de la croissance et de la composition cellulaire des cultures en mode chémostat.

IV. Résultats

Les procédés de production présentés ci-dessus sont pilotés de la même manière en commençant par une phase batch avec un milieu pied de cuve contenant 30 g/L de substrat carboné (PDL contenant 25 g/L de lactose ou 30 g/L de glycérol), s'ensuit une phase Fed-batch permettant une montée en biomasse grâce à l'ajout de milieu d'alimentation concentré à 300 g/L de substrat. L'alimentation est ajoutée de manière exponentielle par une pompe à débit modifiable, le débit est ajusté de manière à apporter la teneur en source carbonée nécessaire à la croissance de la souche et à atteindre la MS cible de 100 g/L. Lors de la phase Fed-batch de la condition sur glycérol la pompe d'ajout ne s'est pas arrêtée, il y a donc eu un surplus de milieu d'alimentation provoquant un dépassement de la concentration en biomasse cible. Le milieu d'alimentation des chémostats ont ensuite été branchés aux bioréacteurs, les milieux des conditions sur milieu PDL ont une concentration en PDL de 265 g/L permettant d'apporter 220 g/L de lactose et de produire 100g/L de biomasse avec un rendement biomasse sur lactose de $0{,}46 g_{MS}/g_{L}$. Le milieu d'alimentation du chémostat sur glycérol est concentré à 200 g/L mais le rendement sur glycérol s'est révélé plus faible que prévu (r_{MSG} = 0,45 au lieu de 0,5 estimé) et la biomasse sèche atteinte en régime permanent était proche de 90 g/L.
L'objectif de ces essais était d'avoir une standardisation des biomasses dans les différentes conditions de culture, de manière à ce qu'elles soient dans le même état cellulaire avec un même taux de croissance imposé afin d'éviter les variations d'expression des gènes provoquées par la croissance des cellules.

La composition cellulaire de la biomasse est similaire dans les quatre conditions de culture. La teneur en protéines est située autour de 50% et celle en sucres totaux autour de 20% que la souche soit cultivée en mixotrophie, hétérotrophie, sur du glycérol ou sur du PDL. La souche FCC3432 a la même proportion de protéines et de sucres totaux que la souche sauvage UTEX2919. Une fois le régime permanent du chémostat atteint (après 500h de culture : 5 fois le temps de séjour), la seule différence observée entre les conditions sur les paramètres que nous avons analysés est la quantité de C-PC produite qui diverge en fonction du mode trophique et du type de souche. La souche UTEX2919 cultivée en hétérotrophie ne produit pas de C-PC que ce soit sur un milieu glycérol ou PDL alors qu'en mixotrophie sur PDL sa teneur intracellulaire en C-PC est de 12 mg/g_{MS}. La souche variante FCC3432 cultivée sur un milieu PDL à l'obscurité produit quant à elle $25 mg/g_{MS}$ de C-PC en hétérotrophie, soit deux fois plus que la souche sauvage en mixotrophie.

Pour chaque condition de culture trois prélèvements de biomasse ont été réalisés sur différents temps du régime permanant des cultures. Les ARNs de chaque condition ont été extraits, la qualité de l'extraction a été vérifiée puis les ARNs ont été séquencés.

b) Contrôle qualité des données de séquençage

L'étape de séquençage Illumina des transcrits de chaque condition de culture a abouti à la création de deux documents Fastq R1 et R2 (*reverse* et *forward*) contenant des séquences (ou *reads*) de 150 nucléotides. Après l'étape de nettoyage des séquences nucléotidiques permettant d'enlever les séquences de faibles qualités et les séquences des adaptateurs (Trimmomatic), les séquences nettoyées représentaient 32,57 millions de lectures avec un %GC égal à 43 (FastQC).

c) Alignement des séquences nucléotidiques sur les génomes de *G. sulphuraria* connus

Les séquences nucléotidiques de la souche UTEX2919 ont été initialement alignées sur le génome annoté de *Galdieria sulphuraria* strain 074W (Schonknecht et al., 2013) et sur le génome non annoté de *Galdieria sulphuraria* strain 107.79 (Davis et al., 2016). La souche 074W est une souche provenant d'Indonésie alors que la souche UTEX2919 provient de la Sonoma en Californie tout comme la souche 107.79. Malgré la distance géographique de la souche 074W par rapport aux deux autres, celles-ci ont été identifiées comme étant du même genre et de la même espèce grâce à des analyses phylogénétiques réalisées à partir des séquences nucléotidiques des gènes rbcL des souches (Ciniglia et al., 2004).

Seulement 0,004% des séquences de la souche UTEX2919 se sont alignées sur le génome de la souche 074W et 13% sur le génome de la souche 107.79. Ce faible pourcentage de séquences alignées avec la souche 107.79 provenant du même endroit géographique que la souche UTEX2919 pourrait être due à la mauvaise qualité du séquençage de ce génome selon les critères utilisés par NCBI. La qualité d'un alignement RNAseq étant considéré comme satisfaisante lorsque plus de 70% des séquences sont alignées sur le génome de référence (Conesa et al., 2016), ces génomes de *G. sulphuraria* n'ont donc pas pu être utilisés pour l'analyse différentielle.

Afin de pouvoir réaliser notre étude d'expression différentielle nous avons dû procéder au séquençage du génome de notre souche d'intérêt UTEX2919.

d) Alignement des séquences nucléotidiques sur le génome *De novo* de la souche UTEX 2919

Le séquençage de l'ADN génomique de la souche UTEX2919 a été réalisé selon le mode de séquençage Illumina HiSeq 2x150pb (Genewize, EU) et nous avons réalisé l'assemblage *de novo* du génome complet de cette souche. Cet assemblage a abouti à la création de 16239 contigs allant de 84946 nucléotides à 200 nucléotides pour un nombre total de 13,26 Mb (Spades). La prédiction des gènes par Augustus a identifié 5412 séquences codantes et 5348 de ces séquences se sont alignées sur des gènes identifiés de la base de données NCBI NR dont 89,6% avec une *e-value* inférieure à 10^{-40}.

Le génome *de novo* de la souche UTEX2919 s'aligne à 99,9% sur les séquences codantes de la souche 107.79 et à 63,01% sur celles de la souche 074W. L'alignement presque parfait des séquences nucléotidiques de la souche UTEX2919 avec celles de la souche 107.79 est étonnant car les transcrits issus de l'expression des gènes de la souche UTEX2919 ne s'étaient pas alignés efficacement sur le génome de cette souche 107.79. La seule explication possible à ce résultat est l'hypothèse d'un décalage du cadre de lecture (505748 nucléotides) sur le génome de 107.79 provoquant un mauvais alignement des transcrits sur ce génome.

Les transcrits des différentes conditions de culture s'alignent à 72% sur le génome de référence UTEX2919 *de novo*, ce qui est conforme à un alignement de qualité (Conesa et al., 2016), ainsi l'analyse de l'expression des gènes a pu être réalisée en fonction des gènes identifiés sur ce génome de référence.

2. Études d'expressions différentielles

a) Mixotrophie vs Hétérotrophie

En comparant les conditions de culture de la souche UTEX2919 en mixotrophie et hétérotrophie nous avions pour objectif principal d'identifier les gènes codant pour la voie métabolique de la C-PC. L'analyse différentielle des transcrits entre le mode de culture mixotrophe et hétérotrophe pour la souche UTEX2919 sur un milieu PDL a permis d'identifier 6 % de gènes différemment exprimés entre ces deux conditions soit 324 gènes dont la fonction a été identifiée par homologie de séquences avec les gènes de la banque de donnée NCBI NR.

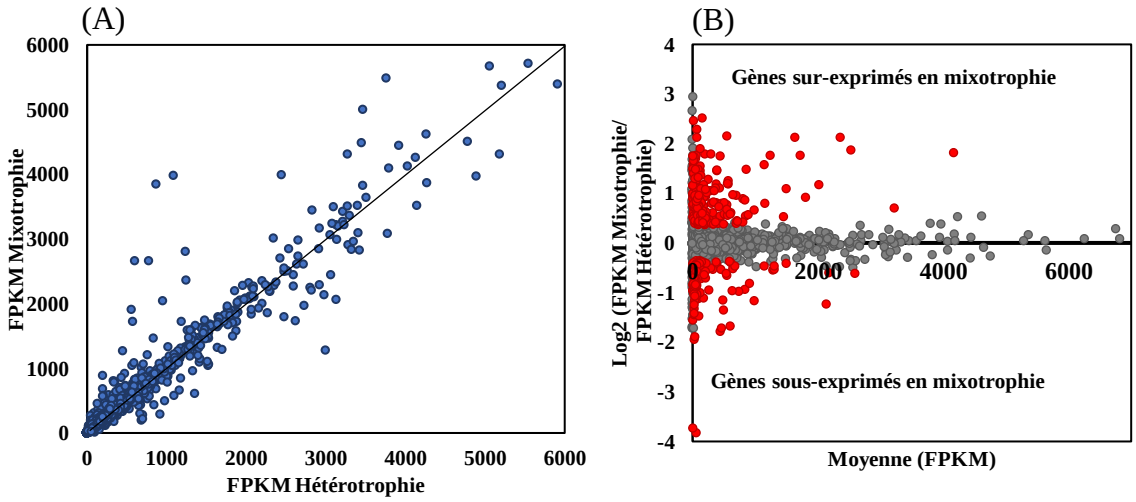


Figure 55. Expression différentielle des gènes entre la souche UTEX 2919 cultivée en Mixotrophie et Hétérotrophie sur un milieu PDL. A) Corrélation entre des transcrits en FPKM (Fragment Par Kilo base Million), B) Représentation du différentiel d'expression par le log2 (Mixotrophie/Hétérotrophie) en fonction de la moyenne en FPKM.

La représentation du comptage de chaque gène (FPKM) en mixotrophie en fonction du comptage en hétérotrophie suit une régression linéaire ce qui permet d'observer que très peu de gènes sont différemment exprimés entre ces deux conditions (points éloignés de la droite de régression linéaire) (Fig. 55A). La représentation utilisant le logarithme de 2 du comptage en mixotrophie par rapport au comptage en hétérotrophie permet de visualiser l'écart d'expression à la moyenne de chacun des gènes identifiés (Fig. 55B). Les points rouges avec un nombre important de FPKM sont peu nombreux, ce qui confirme la faible différence d'expression entre la condition en mixotrophie et celle en hétérotrophie.

Tableau 23. Liste des gènes les plus différemment surexprimés (x3) entre les conditions Mixotrophie et Hétérotrophie

N° gène	Mixotrophie	% Identité	e-value	Facteur de surexpression des gènes en mixotrophie par rapport à l'hétérotrophie	N° gène	Hétérotrophie	% Identité	e-value	Facteur de surexpression des gènes en hétérotrophie par rapport à la mixotrophie
528	Beta-galactosidase *G. sulphuraria*	63,32	0	6	74	Heat shock protein *G. sulphuraria*	72,97	3e-89	14
529	MFS transporter, SP family, sugar:H+ symporter *G. sulphuraria*	89,79	0	6	1699	MFS PHS inorganic phosphate transporter *G. sulphuraria*	92,02	2e-52	13
404	Phycocyanin beta subunit *G. sulphuraria*	99,42	5e-121	5	3716	MFS PHS inorganique phosphate transporter *G. sulphuraria*	87,68	0	4
405	CpcA *Cyanidium caldarium*	100	1e-105	4	5087	MFS transporter, SP family, sugarH+, symporter *G. sulphuraria*	92,38	4,9e-79	4
2022	Carbonic anhydrase *G. sulphuraria*	76,32	2e-127	4	5372	MFS transporter, SP family, sugarH+, symporter *G. sulphuraria*	92,38	2e-61	3
2801	Beta-galactosidase *G. sulphuraria*	77,58	0	4					
3538	Phycobilisome linker polypeptide *G. sulphuraria*	74,4	5e-148	4					
4962	Light-harvesting complex protein *G. sulphuraria*	98,64	9e-98	4					
4967	Phycobilisome linker polypeptide *G. sulphuraria*	94,39	2e-51	4					
3730	Low molecular mass early light-inducible HV60 (hypothetical protein Gasu_47790) *G. sulphuraria*	91,04	1e-35	3					
4011	MFS SP sugar:H+ symporter *G. sulphuraria*	73,91	1e-25	3					
4033	Photosystem I subunit O precursor *G. sulphuraria*	79,73	6e-81	3					
395	Light-harvesting complex protein *G. sulphuraria*	100	9e-104	3					

Les gènes les plus surexprimés en mixotrophie sont essentiellement liés au métabolisme chloroplastique et plus particulièrement au phycobilisome avec une surexpression des polypeptides de structure du PSB (N°3538, 4967), de la chaine α et β des apoprotéines de la C-PC (N°404, 405), d'un précurseur de la sous-unité O du PSI (N°4033) et des protéines collectrices de la lumière (N°395, 4962). Il n'y a pas de différence d'expression significative entre ces deux conditions pour les gènes codant pour les chaines α et β de l'allophycocyanine (APC) ou bien pour les gènes codant pour des phycocyanobiline (PCB) lyase. Certains gènes du métabolisme carboné sont également surexprimés en mixotrophie par rapport à l'hétérotrophie comme les enzymes β-galactosidase (N°528, 2801) et une anhydrase carbonique (N°2022) et des symporteurs de sucre de la famille des MFS (Major Facilitator Superfamily) (N°529, 4011). En hétérotrophie deux MFS symporteurs de sucres/H^+ sont également surexprimés par rapport à la mixotrophie (N°5087, 5372), des transporteurs de phosphate inorganique de la famille des PHS (Phosphate H^+/Symporter) (N°1699, 3716) ainsi qu'une protéine de choc thermique (N°74).

b) Perméat de lait vs Glycérol

La comparaison de l'expression des gènes de la souche UTEX2919 entre la condition PDL et Glycérol avait pour objectif d'identifier un ou des gènes codant pour des transporteurs de lactose.

L'analyse différentielle des transcrits de la souche UTEX2919 cultivée sur du PDL ou sur glycérol en hétérotrophie a permis d'identifier 1203 gènes exprimés différemment de façon significative ce qui représente 22,22 % des gènes de la souche UTEX2919. Parmi ces 1203 gènes déterminés comme ayant une expression différente, seulement 8 n'ont pas été identifiés fonctionnellement avec les protéines de la base de données NCBI NR. La différence

d'expression des gènes entre les conditions changeant de substrat est plus importante (x3,7) que pour un changement de mode trophique.

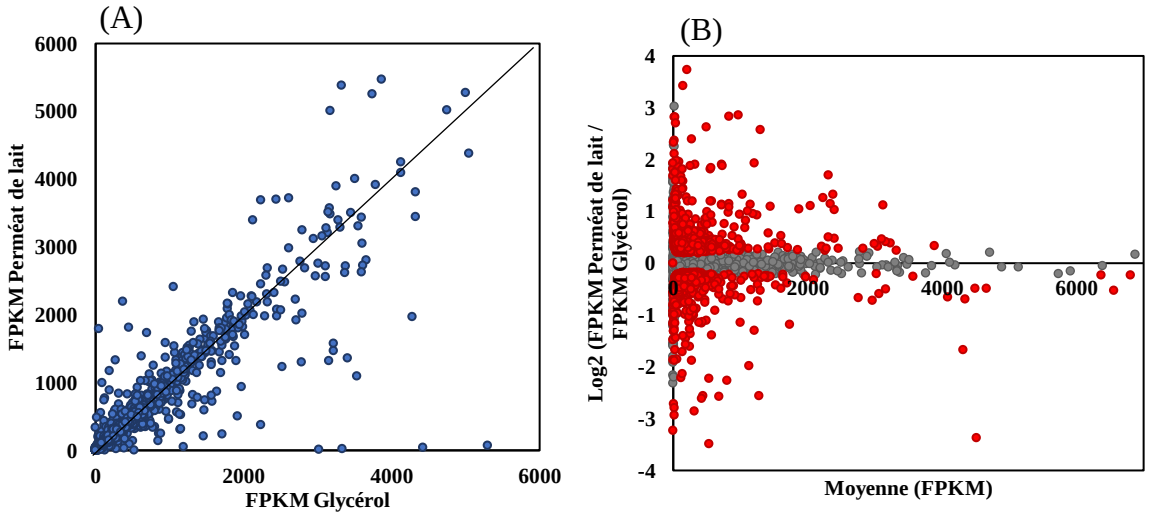


Figure 56. *Différentiel d'expression des gènes entre la souche UTEX 2919 cultivée sur un milieu Perméat de lait et un milieu Glycérol en hétérotrophie. A) Corrélation entre les transcrits en FPKM (Fragment Par Kilo base Million) des deux conditions B) Représentation du différentiel d'expression par le log2 (PDL/Glycérol) en fonction de la moyenne en FPKM.*

Les représentations de la Figure 56 permettent d'évaluer la quantité de gènes différemment exprimés entre la condition sur PDL et celle sur glycérol, le nombre de point s'écartant de la ligne de régression (Fig. 56A) et les points rouges (Fig. 56B) avec un FPKM élevés sont nombreux et mettent en valeurs l'important différentiel d'expression existant entre ces deux conditions.

Tableau 24. *Liste des gènes les plus différemment surexprimés (x5) entre les conditions Perméat de lait et la condition glycérol.*

N°gène	Perméat de lait	% identité	*e-value*	Facteur de surexpression des gènes sur milieu PDL par rapport au glycérol	N°gène	Glycérol	% identité	e-value	Facteur de surexpression des gènes sur milieu glycérol par rapport au PDL
1096	MFS SP sugar:H+ symporter *G. sulphuraria*	90,04	0	302	3727	MFS SP sugar:H+ symporter *G. sulphuraria*	95,07	0	88
3060	Alpha-glucosidase isoform 1 *G. sulphuraria*	83,52	1e-160	198	1768	Aquaglyceroporin protein, MIP family *G. sulphuraria*	89,59	0	41
575	Beta-galactosidase *G. sulphuraria*	88,43	0	183	3690	MFS transporter SP sugar:H+ symporter *G. sulphuraria*	72,37	2e-18	31
4011	MFS SP sugar:H+ symporter *G. sulphuraria*	73,91	1e-25	121	3838	NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase *G. sulphuraria*	84,03	2e-121	24
3646	Alpha-glucosidase *G. sulphuraria*	93,33	9e-144	96	3068	Glycerol dehydrogenase *G. sulphuraria*	80,81	1e-166	11
4564	Alpha-glucosidase *G. sulphuraria*	90,8	5e-103	77	1134	Glutathione-independent formaldehyde dehydrogenase *G. sulphuraria*	98,15	2e-103	10
2838	MFS SP sugar:H+ symporter *G. sulphuraria*	91,87	0	44	696	Amino acid/auxin permease, AAAP family *G. sulphuraria*	89,47	0	7
3716	MFS PHS inorganic phosphate transporter *G. sulphuraria*	92,02	0	42	697	Lactoylglutathione lyase *G. sulphuraria*	77,85	0	7
2801	Beta-galactosidase *G. sulphuraria*	77,58	0	13	1060	Primary-amine oxidase *G. sulphuraria*	88,2	0	7
435	Metal transporter (Mn2++-iron) Nramp5 family *G. sulphuraria*	70,7	0	11	3051	Phosphoenolpyruvate synthase *G. sulphuraria*	88,49	4e-157	6
432	MFS transporter, SP family, sugar:H+ symporter *G. sulphuraria*	91,76	0	7	5327	Phosphoenolpyruvate synthase *G. sulphuraria*	89,31	2e-72	6
5372	MFS transporter, SP family, sugar:H+ symporter *G. sulphuraria*	92,38	2e-51	7	3247	Aquaglyceroporin protein, MIP family *G. sulphuraria*	91	7e-174	5
687	MFS transporter, SP family, sugar:H+ symporter *G. sulphuraria*	93,07	0	6					
1519	Alpha-mannosidase *G. sulphuraria*	65,45	4e-130	5					
5410	MFS transporter, SP family, sugar:H+ symporter *G. sulphuraria*	95	6e-46	5					
2287	Acetate transporter *G. sulphuraria*	88,89	2e-78	5					

IV. Résultats

Le comparatif de l'expression des gènes de la souche UTEX2919 dans la condition PDL par rapport à la condition Glycérol montre une surexpression des gènes liés au transport de sucre (MFS transporteur sugar/H^+ symporter) (N°432, 687,1096, 2838, 4011, 5372, 5410) et à la métabolisation du lactose en glucose et galactose avec une surexpression des gènes de la β-galactosidase (N°575, 2801). Une surexpression de gène codant pour des enzymes liées à la digestion du glycogène comme α-glucosidase (N°3060, 3646, 4564) et α-mannosidase (N°1519, 3646) est remarquée sur le milieu PDL. Un gène lié à l'expression d'un transporteur de métal Manganèse-fer (N°435) est également surexprimé dans cette condition de culture.

La souche cultivée en milieu glycérol a une surexpression des gènes liés au métabolisme du glycérol comme les gènes d'aquaglyceroporines (N°1768, 3247) et deux gènes codant pour des transporteurs de sucres (sugar/H^+ symporteur) (N°3690, 3727) appartenant à la superfamille des MFS. Des gènes codant pour des enzymes du métabolisme carboné (N°3051, 3068, 5327) sont surexprimés sur glycérol. Enfin des gènes liés au métabolisme du glutathion (N°697, 1134) et des gènes codant pour des transporteurs transmembranaires d'acides aminés issus de la famille AAAP (Auxine Acides Aminés Perméase) (N°696) sont également surexprimés dans cette condition.

Cette analyse différentielle de l'expression des gènes de la souche UTEX2919 entre la condition sur PDL et celle sur glycérol nous a permis d'identifier des gènes codant pour des transporteurs de sucres et des β-galactosidases. Étant donné qu'aucune libération de glucose n'est observée dans le milieu extracellulaire au cours de la culture sur PDL nous pouvons penser que les β-galactosidases induites ne sont pas excrétés mais plutôt intracellulaires. La métabolisation du lactose nécessiterait alors une entrée de ce sucre dans la cellule *via* un ou des transporteurs spécifiques ou pas à ce substrat. Les gène N°1096, 4011 et 2838 codant pour des transporteurs de sucre et surexprimés 302, 121 et 44 fois respectivement entre la condition sur milieu PDL et celle sur glycérol pourrait être des transporteurs effectuant le transfert du lactose dans la cellule de *G. sulphuraria*.

c) Sauvage vs Variant

La comparaison de l'expression des gènes entre la souche sauvage et le variant FCC3432 avait pour visée d'identifier la nature des gènes ayant été dérégulés chez ce variant et permettant la production de C-PC en hétérotrophie sur PDL.
L'analyse différentielle des transcrits entre la souche sauvage UTEX2919 et la souche variante FCC3432 cultivées sur un milieu PDL en hétérotrophie a permis d'identifier 1270 gènes différemment exprimés ce qui représente 23,47 % des gènes de la souche UTEX2919. Parmi ces 1270 gènes déterminés comme ayant une expression différente seulement 12 n'ont pas été identifiés fonctionnellement. La différence d'expression entre les gènes de la souche sauvage et ceux de la souche variante est 4 fois plus importante que celle entre la mixotrophie et l'hétérotrophie. Les différences d'expression significatives mesurées entre les conditions mixotrophie et hétérotrophie sont essentiellement liées au métabolisme de production de C-PC alors qu'entre la souche UTEX2919 et la souche FCC3432 d'autres gènes notamment ceux codant pour le métabolisme carboné sont exprimés différemment.

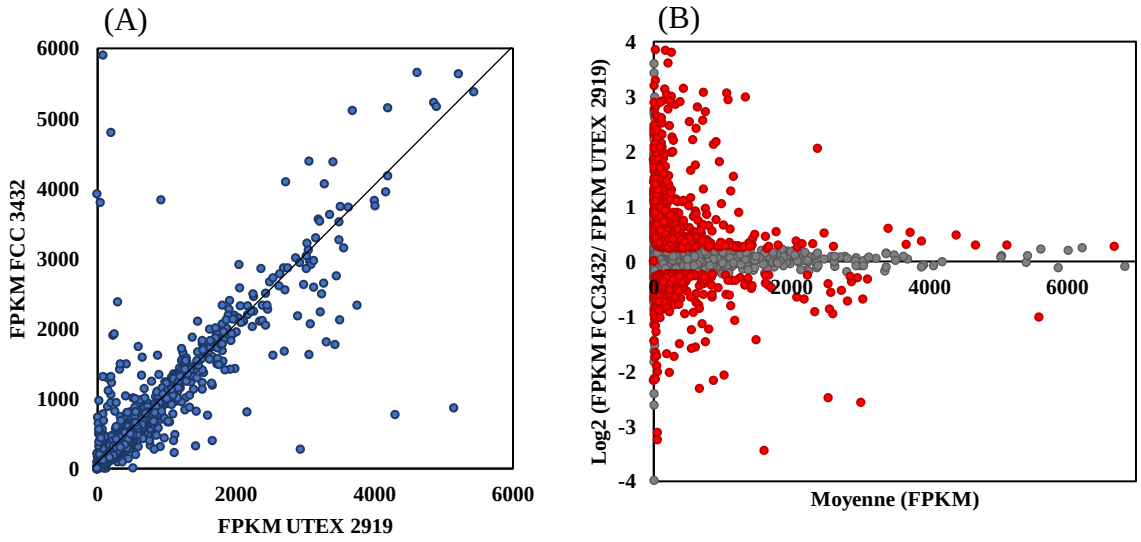


Figure 57. Différentiel d'expression des gènes entre la souche UTEX 2919 et la souche FCC3432 cultivées sur un milieu PDL en hétérotrophie. A) Corrélation entre des transcrits en FPKM (Fragment Par Kilo base Million), B) Représentation du différentiel d'expression par le log2 (FCC3432/UTEX2919) en fonction de la moyenne en FPKM.

La figure 57 représentant l'expression des gènes chez la souche FCC3432 en fonction de leur expression chez la souche UTEX2919 permet d'observer que certains gènes sont très différemment exprimés avec des points très éloignés de la ligne de régression linéaire (Fig. 57A). Cette différence significative d'expression de certains gènes est également remarquable sur la représentation du log2 du rapport d'expression (Fig. 57B)

Tableau 25. Liste des gènes les plus différemment exprimés (x20) entre la souche sauvage UTEX2919 et la souche variante FCC3432

N° Gène	FCC3432	% identité	*e-value*	Facteur de surexpression des gènes de la souche FCC3432 par rapport à la UTEX2919	N° Gène	UTEX2919	% identité	*e-value*	Facteur de surexpression de la souche UTEX2919 par rapport à la FCC3432
1442	Myo-inositol 2-dehydrogenase *G. sulphuraria*	91,55	0	139	1096	MFS SP sugar:H+ symporter *G. sulphuraria*	90,04	0	264
2897	Thréonine-3-dehydrogenase *G. sulphuraria*	59,35	4e-56	116	1699	Hypothetical protein Gasu_58270 *G. sulphuraria*	72,97	2e-52	76
4640	Pre translocase subunit *G. sulphuraria*	72,12	4e-105	90	2838	MFS SP sugar:H+ symporter *G. sulphuraria*	91,87	0	60
404	Phycocyanin beta subunit *G. sulphuraria*	99,42	6e-121	83	3716	MFS PHS inorganic phosphate transporter *G. sulphuraria*	92,02	0	21
3538	Phycobilisome linker polypeptide *G. sulphuraria*	74,4	5e-148	82					
4967	Phycobilisome linker polypeptide *G. sulphuraria*	94,39	2e-51	75					
4962	Light-harvesting complex protein *G. sulphuraria*	98,64	9e-98	45					
405	CpcA *Cyanidium caldarium*	100	1e-105	43					
2801	Beta-galactosidase *G. sulphuraria*	77,58	0	38					
2022	Carbonic anhydrase *G. sulphuraria*	76,32	1e-157	35					
559	Photosystem II protein D1 *G. sulphuraria*	99,17	0	26					
2727	Fructose-1,6-bisphosphatase I *G. sulphuraria*	85,4	0	23					
395	Light-harvesting complex protein *G. sulphuraria*	100	1e-103	21					
3521	Sugar-phosphate; phosphate translator *G. sulphuraria*	83,74	1e-112	20					

IV. Résultats

De nombreux gènes sont différemment exprimés entre la souche sauvage UTEX2919 et la variante FCC3432, les gènes étant au minium 20 fois surexprimés par rapport à l'autre condition sont présentés dans le tableau 25.

Des gènes liés au métabolisme de biosynthèse de la C-PC et au métabolisme carboné sont très largement surexprimés chez la souche FCC3432 par rapport à la souche sauvage. Des gènes codant pour des polypeptides « linker » structurant le PSB (N°3538, 4967) 4967), les sous-unités α et β de la C-PC (N°404, 405), des protéines collectrices de lumière (N°395, 4962) ainsi que la protéine D1 du PSII (N°559) sont surexprimés chez la souche variante par comparaison avec la souche sauvage. Une oxydoréductase (thréonine 3-dehydrogenase) (N°2897) pouvant intervenir dans le métabolisme de la glycine qui est à la base de la voie métabolique de la C-PC est également largement surexprimée chez le variant.

Des enzymes de la voie métabolique carbonée telle que la β-galactosidase (N°2801), l'inositol déshydrogénase (N°1442) et l'anhydrase carbonique (N2022) sont également surexprimées chez la souche FCC3432.

Deux gènes codant pour des symporteurs sucre/H^+ sont surexprimé chez la souche UTEX2919 par rapport à la souche FCC3432 cultivée sur le même milieu en présence de PDL, le gène N°1096 surexprimé 264 fois et le gène N°2838 surexprimé 60. Pour des souches étant cultivées dans les mêmes conditions et sur un même substrat organique (le lactose) et en hétérotrophie, il est étonnant d'obtenir des transporteurs de sucres avec une aussi forte différence d'expression. La souche UTEX2919 surexprime également des gènes codant pour des transporteurs de phosphate inorganique par rapport à la souche FCC3432.

3. Gènes fortement exprimés et corrélation

Les gènes les plus surexprimés d'une condition par rapport à l'autre sont essentiellement liés au métabolisme carboné et au système de production de la C-PC.

Des gènes codant pour des enzymes de digestion de lactose (β-galactoside) ou de polysaccharides de réserve (glucosidase) ainsi que des gènes codant pour des symporteurs de sucres/H+ sont fortement surexprimés dans les conditions de cultures sur du PDL.

Les gènes codant pour les sous-unités α et β de la C-PC, les protéines linker du PSB ainsi que ceux codant pour la protéine D1 du PSII ou pour une antenne collectrice sont fortement surexprimés dans les conditions productrices de C-PC : chez la souche UTEX2919 cultivée en mixotrophie (12mg/g_{MS}) et la souche variante FCC3432 en hétérotrophie (25mg/g_{MS}).

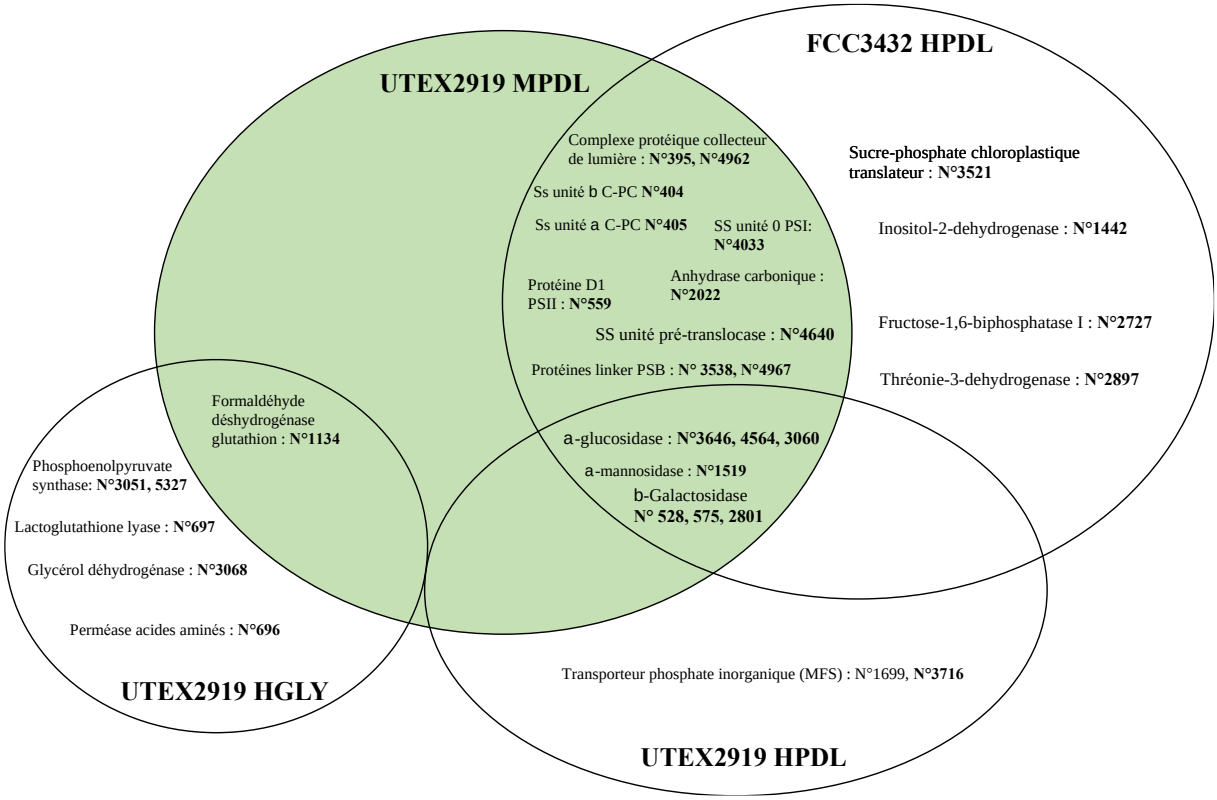


Figure 58. Diagramme représentant les gènes (hormis les transporteurs) les plus surexprimés d'une condition à l'autre.

Les gènes identifiés sont surexprimés dans la condition dans laquelle ils sont positionnés par rapport aux autres conditions et ceux présents dans les intersections sont surexprimés dans les conditions croisées par rapport à celles extérieures à l'intersection.

Des gènes codant pour des α-glucosidase, α-mannosidase, β-galactosidase sont surexprimés dans les 3 conditions utilisant un milieu de culture PDL en comparaison avec l'expression des gènes sur un milieu glycérol. Certains gènes codant pour des enzymes du métabolisme carboné sont également surexprimés chez la souche variante par rapport aux autres conditions.

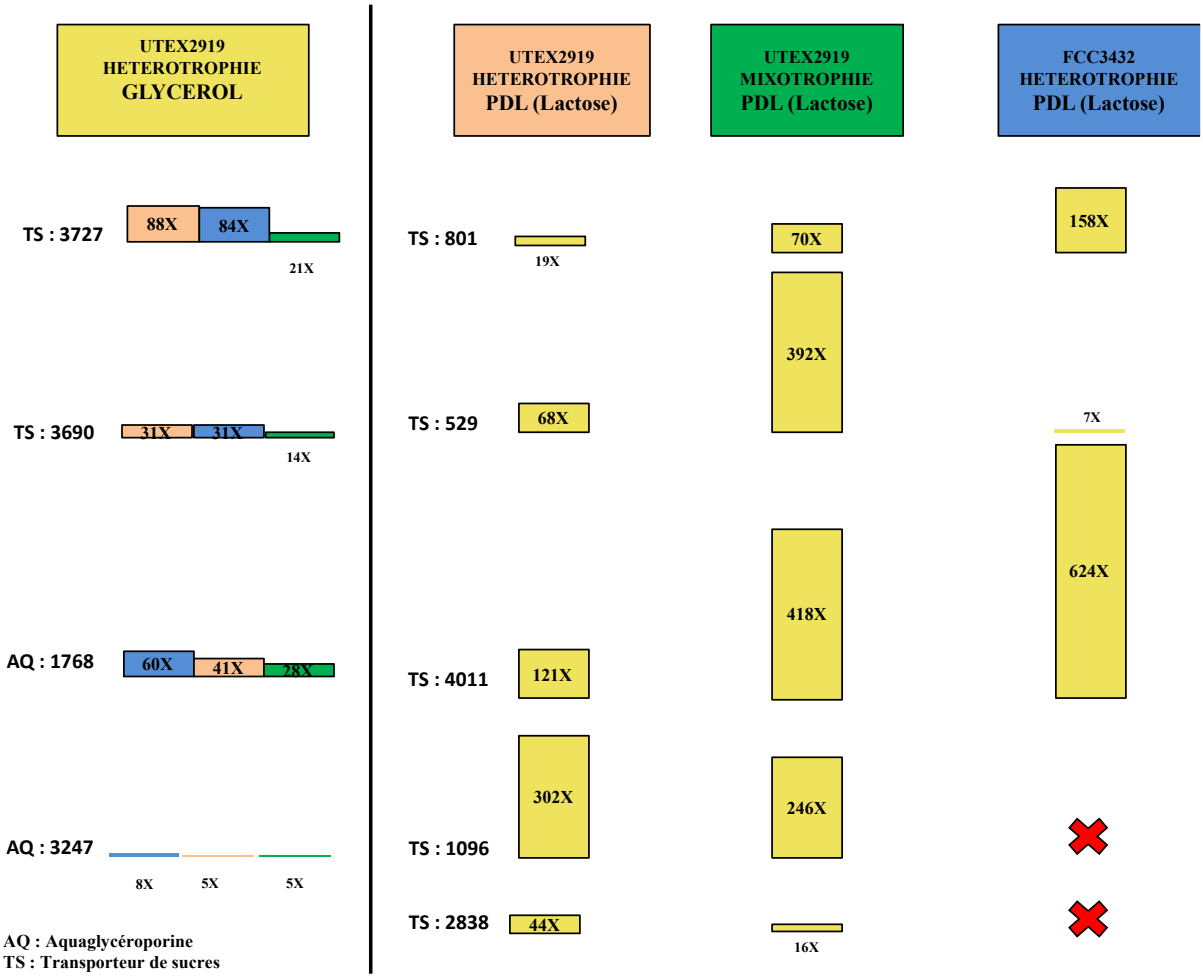


Figure 59. Comparaison des gènes codant pour des transporteurs de sucres et aquaglycéroporines les plus surexprimés (x10) entre la condition sur glycérol et les conditions sur PDL. Les numéros des gènes surexprimés sur glycérol par rapport aux conditions sur PDL et leur facteur de surexpression sont indiqués dans la partie de gauche. Les numéros des gènes surexprimés sur PDL par rapport à la condition sur glycérol et leur facteur de surexpression sont indiqués dans la partie de droite. La croix rouge signifie qu'il n'y a pas de surexpression des gènes par rapport à la condition comparée.

L'objectif de l'étude étant d'identifier un ou des transporteurs de lactose, nous avons sélectionné les gènes ayant les plus importantes variations d'expression entre la condition sur glycérol et celles sur PDL. Les gènes surexprimés sur le milieu glycérol par rapport aux conditions PDL sont les gènes N°3727 et 3690 codant pour des symporteurs de sucres/H^+ et les aquaporines N°1768 et N°3247. Les gènes codant pour des transporteurs de sucres les plus surexprimés sur les conditions PDL par rapport à la condition sur glycérol sont les N°801, 529, 4011, 1096 et 2838. Le niveau de surexpression de ces gènes dans les 3 conditions sur PDL est indiqué par rapport à la condition sur glycérol.

Le nombre de surexpression des gènes codant pour les Transporteurs de Sucre (TS) sur les conditions PDL par rapport à la condition glycérol varie en fonction des conditions de culture (Mixotrophie et hétérotrophie) et de la souche UTEX2919 ou FCC3432. Au total 14 gènes codants pour des transporteurs de sucres ont été exprimés différemment entre les conditions étudiées. Le gène N°4011 est très largement surexprimé dans l'ensemble des conditions de culture sur un milieu PDL par rapport à la condition sur glycérol, ce gène pourrait donc coder pour un transporteur de lactose primordial à l'absorption du lactose chez la souche *G. sulphuraria*.

IV. Résultats

Trois gènes liés au transport de sucres sont fortement surexprimés chez la souche sauvage lorsqu'elle est cultivée sur un milieu PDL mais ne le sont pas chez la souche variante FCC3432, ce sont les gènes N°3690, N°1096 et N°2838. La souche FCC3432 aurait hérité d'une modification de l'expression des gènes liés au métabolisme carboné en plus de celle liée à la production de C-PC. Le gène 529 est le plus fortement exprimé dans les conditions de mixotrophie, ce qui pourrait suggérer un rôle plus spécifique pour ce transporteur dans l'absorption du lactose à la lumière. Il est à remarquer que ce gène est induit 6X en condition MPDL par rapport à la condition HPDL tout comme la β-galactosidase 528. Ces gènes sont en tandem sur le génome cela peut suggérer une régulation commune pour le transport et le métabolisme du lactose en mixotrophie.

4. Conclusions sur l'analyse différentielle de l'expression des gènes chez *G. sulphuraria*

L'objectif de cette étude différentielle de l'expression des gènes était de mettre en évidence la différence des systèmes de transport de sucre entre le glycérol et le lactose. Nous voulions identifier les gènes du métabolisme du lactose codant pour des transporteurs et enzymes ainsi que les gènes liés à la production de C-PC.

Une plus faible différence d'expression des gènes a été remarquée entre la souche UTEX2919 cultivée en mixotrophie et hétérotrophie que dans les autres conditions comparatives. Cette souche sauvage a une variation de seulement 6% de l'expression de ces gènes entre la condition en présence de lumière et celle à l'obscurité. Parmi ces gènes différemment exprimés le facteur de surexpression d'une condition par rapport à l'autre est faible <6 sauf pour deux gènes codant pour une protéine de choc thermique (x14) et un transporteur de phosphate inorganique (x13) qui sont surexprimés en hétérotrophie.
La majorité des gènes identifiés comme différemment exprimés sont des gènes liés au métabolisme de synthèse de la C-PC (chaine α et β de la C-PC, protéines linker et collectrices de lumière) surexprimés en présence de lumière. Ces mêmes gènes ont été également surexprimés chez la souche variantes FCC3432 comparé à la souche UTEX2919 cultivées en hétérotrophie.

Les gènes différemment exprimés entre la culture de la souche UTEX2919 sur PDL et celle sur glycérol sont pour la majorité des gènes liés au métabolisme carboné. Sept gènes codant pour des symporteurs sucre/H^+ sont surexprimés sur PDL ainsi que des enzymes de digestion (β-galactosidase, α-glucosidase et α-mannosidase). Sur le milieu Glycérol, deux gènes codant pour des aquaglycéroporines sont surexprimés, deux gènes de symporteurs de sucre/H^+ ainsi qu'une enzyme glycérol déshydrogénase. La souche FCC3432 et la souche UTEX2919 cultivées sur PDL ont tout de même une variation d'expression de certains gènes liés au métabolisme carboné tel que des gènes codant pour des transporteurs de sucre ou des enzymes.

D. Potentiel nutritionnel du produit et capacité dépolluante du procédé

Un des objectifs de ce projet est de développer un procédé de production d'une nouvelle source de protéines permettant de répondre aux besoins du marché tout en utilisant un substrat alternatif permettant de limiter l'emprunte carbone du procédé de production. La faisabilité et les performances du procédé de production ont été établi dans la partie IV-A et la culture en mode chémostat permet de produire une biomasse stable et « standardisée » avec le même contenu cellulaire en protéines et sucres totaux que la souche soit cultivée sur un milieu glycérol ou PDL (Fig. 54).

Le potentiel nutritionnel du produit *Galdieria sulphuraria* et la capacité dépolluante du procédé de production est mesurée dans cette partie à partir de la biomasse issue d'une production en bioréacteur en continu de la souche FCC3432 (Fig. 45).

1. Qualité nutritionnelle de la biomasse de *G. sulphuraria*

La biomasse de la souche FCC3432 *G. sulphuraria* obtenue à la fin du bioprocédé sur un milieu PDL en hétérotrophie a été concentrée, lavée, broyée. Une fois séchée le produit se présente sous forme d'une poudre bleue verte avec une légère odeur herbacée, et sans goût marqué (Fig. 60).



Figure 60. Photo du produit final à base de *Galdieria sulphuraria*

2. Valeurs énergétiques et nutritionnelles

Tableau 26. Composition cellulaire du produit G. sulphuraria

Galdieria	100g
Énergie	1731kJ 410kcal
Protéines N*6,25	48g
Glucides assimilables	15,26g
Matière grasse totale	6,26g
Fibres alimentaires	9,34g
Sodium	Traces
Équivalent sel	0,0178g

L'analyse nutritionnelle de la biomasse *Galdieria sulphuraria* permet d'identifier le potentiel nutritif du produit.
Cette biomasse contient au moins 48% de protéines et peut être considérée comme riche en protéines. L'allégation nutritionnelle « riche en protéines » est valable pour une denrée alimentaire si au moins 20% de la valeur énergétique de la denrée est produite par les protéines (Règlement (CE) no 1924/2006). La valeur énergétique d'une protéine peut être estimé à 4,0

kcal/g (FAO, 2017) ainsi l'apport énergétique des protéines de la biomasse de *G. sulphuraria* est de 192 kcal ce qui représente 46,3% de la valeur énergétique totale.
La présence de plus de 6% de fibres dans le produit permet également de prétendre à une allégation « riche en fibres » (Règlement (CE) no 1924/2006).

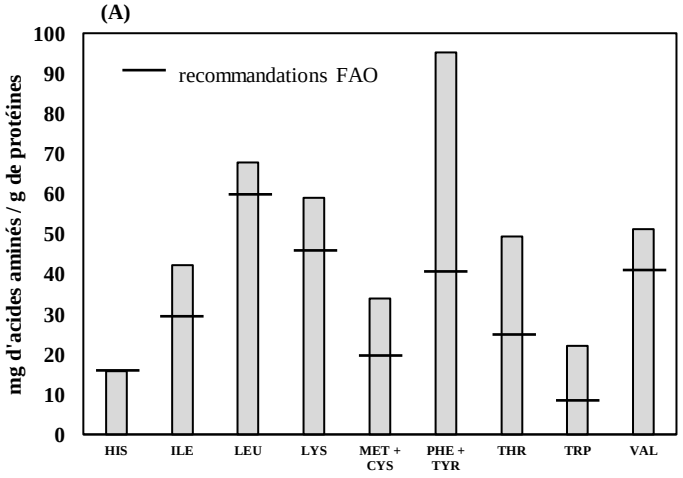
Tableau 27. Dosage des différents types d'acides gras (méthode interne GC/FID de Eurofins)

	Moyenne	**Écart type**	**Unité**
Acides gras saturés	2,326	0,532	g/100g
Acides gras mono-insaturés	1,986	0,494	g/100g
Acides gras polyinsaturés	1,68	0,456	g/100g
Acides gras trans	<0,01	-	g/100g
Autres acides gras	<0,01	-	g/100g
Somme acides gras	5,994	0,826	g/100g
Acides gras oméga 3	0,17	0,176	g/100g
Acides gras oméga 6	1,488	0,432	g/100g
Rapport oméga 6/oméga 3	8,75	2,45	

Les lipides produits par la souche de *G. sulphuraria* sont principalement des lipides membranaires. Ils sont composés de 1/3 d'acides gras saturés, 1/3 d'acides gras mono-insaturés et 1/3 de polyinsaturés. Parmi ces acides gras polyinsaturés la quantité d'Oméga 6 est 8,75 fois supérieure aux Oméga 3 (Tab. 27).

a) Composition en acides aminés

La biomasse de *Galdieria sulphuraria* contient 48% de protéines et le profil en acides aminés met en évidence la valeur nutritionnelle de ces protéines de par leur composition en acides aminés essentiels. La proportion des acides aminés essentiels dans les protéines est supérieure aux quantités recommandées par la FAO ce qui permet d'affirmer la qualité nutritive de ces protéines. (Fig. 61).
Les tests *in vitro* réalisé selon la méthode de Boisen montre que les protéines de *Galdieria sulphuraria* sont digestible à 92,2%. En prenant en compte cette digestibilité des protéines pour le calcul du PDCAAS (Score des Acides Aminés Corrigé de la Digestibilité des Protéines) nous obtenons une valeur de 0,9.



(B)

Galdieria sulphuraria	100g
Phycocyanine (C-PC)	3
Tryptophane	1,1
Thréonine	2,47
Acide aspartique total	3,72
Sérine	2,73
Lysine	2,95
Valine	2,56
Proline	3,23
Alanine	2,44
Phénylalanine	1,95
Isoleucine	2,11
Glycine	1,91
Tyrosine	2,81
Arginine	2,55
Leucine	3,39
Histidine	0,784
Acide glutamique	6,18
Méthionine	0,928
Cystéine + Cystine	0,766

Figure 61. Composition protéique de G. sulphuraria. A) Teneur en acides aminés essentiels et recommandations de la FAO (FAO Expert Consultation, 2013) pour la identifié la qualité nutritive des protéines. B) Composition en acides aminés.

b) Vitamines

Le produit est composé d'une quantité importante de vitamines, avec 3,2mg de riboflavine et 0,56mg d'acide folique il peut prétendre à une allégation « source de riboflavine » (> 1,4mg) et « source d'acide folique » (>200µg) (Annexe du règlement (CE) no 1924/2006).

Du coenzyme Q10 a également été dosé dans la biomasse de *G. sulphuraria* avec une teneur de 55,54 ± 2,8 mg/g.

Tableau 28. Teneur en vitamines de Galdieria sulphuraria

Galdieria sulphuraria	**100g**
Vitamine E	3,7mg
Biotine, Vitamine B8	7,52µg
Thiamine, Vitamine B1	0,15mg
Riboflavine, Vitamine B2	3,2mg
Vitamine B6	0,59mg
Acide folique, Vitamine B9	0,56mg
Niacine, Vitamine B3	4,2mg
Acide pantothénique, Vitamine B5	5 mg
Vitamine B12	0mg

c) Sels minéraux

Grâce à sa composition cellulaire contenant 35,6 mg de fer et 18,54 mg de manganèse, la biomasse de *G. sulphuraria* peut prétendre à l'allégation « source de fer » (>14mg), source de manganèse (>2mg) (Annexe du règlement (CE) no 1924/2006).

d) Pigments

La souche *G. sulphuraria* contient essentiellement des chlorophylles a, de la zéaxanthine, β-carotène et de la C-PC comme pigment.

Les caroténoïdes sont des pigments présents chez les végétaux et sont responsables de la couleur rouges, orangées, jaunes et vertes des fruits, des légumes, des fleurs et des algues. De nombreux compléments alimentaires riches en caroténoïdes sont présents sur le marché mais aucune revendication santé officielle de ces pigments n'a été reconnue par l'EFSA (European Food Safety Autority) et la commission européenne (https://eurekasante.vidal.fr).

Tableau 29. Composition en pigments de Galdieria

Galdieria sulphuraria	**100g**
Zéaxanthine (mg)	46,4
Lutéine (mg)	0
Astaxanthine (mg)	0
Esters d'astaxanthine (mg)	0,6
Canthaxanthine (mg)	0
Chlorophylle a (mg)	34
β-carotène (mg)	19,1
C-PC (mg)	3000

e) Activité antioxydante

Un test ORAC sur la biomasse de *Galdieria sulphuraria* a été effectué afin d'évaluer son potentiel antioxydant *in vitro*. Ce test utilise les propriétés de fluorescence des phycoérythrines (PE) et mesure l'intégrité physique et chimique de ces protéines suite à leur oxydation par des radicaux libres. Le potentiel antioxydant d'un élément est mesuré en le mettant en contact avec des radicaux libres (radicaux peroxyles, hydroxyles) et la PE. La fluorescence est mesurée au cours du temps et son degré de diminution est la conséquence de la dégradation de la PE par les radicaux libre. Le résultat final est exprimé par rapport à une référence d'antioxydant (Trolox) qui est un analogue de la vitamine E soluble dans l'eau (Benedetti et al., 2010).

Galdieria sulphuraria	**Activité antioxydante (µmol Trolox/g d'extrait sec)**
n = 3 répétitions	439 ± 14

Ce résultat indique une activité antioxydante *in vitro* ce qui n'indique en rien l'activité *in vivo* que peut avoir la biomasse de *G. sulphuraria*.

3. Sécurité alimentaire

Le procédé de production de *G. sulphuraria* est réalisé en bioréacteur en condition fermée et contrôlée. La stérilité est maintenue tout au long de la culture et les composés du milieu de culture sont tous autorisés dans l'alimentation humaine. Le pH acide de la culture réduit grandement les risques de contamination extérieures par un autres organismes.

Tableau 30. Métaux lourds dosés

Galdieria sulphuraria	**100g**	**Méthode**	**Spécifications**	**Règlement**
Plomb (mg/kg)	0,008	Interne ICP-MS	<3	629/2008
Cadmium (mg/kg)	0,032	Interne ICP-MS	<3	629/2008
Arsenic (mg/kg)	<0,05	Interne ICP-MS	<3	Critère CEVA
Mercure (mg/kg)	<0,0005	Interne ICP-MS	<0,1	629/2008

La teneur en Plomb et en Cadmium de notre produit est conforme au règlement 629/2008 pour les compléments alimentaires avec des teneurs inférieures à 3 mg/kg. Le règlement déterminant les teneurs maximales d'Arsenic dans les denrées alimentaire est le règlement 2015/1006 mais aucun critère n'est défini pour les compléments alimentaires ou les denrées à base de microalgues, c'est pourquoi nous prenons en compte le critère du CEVA (Centre d'étude et de valorisation des algues) qui fixe une teneur maximale d'Arsenic à 3 mg/kg. Enfin pour le Mercure les recommandations Française suivent le règlement 629/2008 établissant une denrée conforme lorsque la teneur en Mercure est inférieure à 0,1 mg/kg. Notre produit est conforme pour les 4 métaux lourds.

IV. Résultats

Tableau 31. Contaminants microbiologiques dosés

Galdieria sulphuraria	**UFC/g**	**Méthode**	**Spécifications (Règlement 2073/2005)**
Micro-organismes à 30°C (CFU/g)	1600	NF ISO 4833-1	$<10^5$
Bactéries sulfitoréductrices à 46°C (CFU/g)	<10	NF V08-061	< 10
Clostridium perfringens à 37°C (CFU/g)	<1	NF EN ISO 7937	< 1
Coliformes thermotolérants à 44°°C (CFU/g)	<10	NF V08-060	< 10
Salmonella spp (Négative/25g)	Négative	BRD 07/11-12/05	Négative
Staphylococcus à coagulase + à 37°C (CFU/g)	<100	BRD 07/09-02/05	< 100
Listeria monocytogenes à 37°C (CFU/g)	Négative	AES 10/03-09/00	Négative

Les teneurs en microorganismes contaminants sont conformes au règlement 2073/2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires

4. Effet bio-remédiation du procédé du production

Les problématiques liées aux coproduits de l'industrie laitière sont majoritairement liées à la forte charge organique en lactose et minéraux obligeant un retraitement de ces éléments et les organismes utilisant le lactose et résistant à de fortes concentrations en minéraux sont rares. La DCO de ces coproduits est essentiellement influencée par la concentration en lactose, le PDL concentré à 30 g/L dont 25 g/L de lactose a une DCO de 33,46 g/L et le PDL concentré à 300 g/L avec 250 g/L de lactose a une DCO de 331,5 g/L.

Tableau 32. Suivi de la DCO des milieux et surnageants de culture

	DCO (Demande Chimique en Oxygène)	**g/L**
	Perméat de lait concentré à 30 g/L	33,46
Phase Batch	Milieu de culture avec 30 g/L PDL	37,57
	Surnageant en fin de Batch	3,6
	PDL concentré à 300 g/L	331,5
Procédé en chémostat	Surnageant de fin de procédé	28,5

La demande chimique en oxygène permet d'évaluer la charge polluante des milieux, le milieu Batch du procédé de production concentré à 30 g/L de PDL a une valeur de DCO de 37,57 g/L sachant que 90% de cette charge polluante est apporté par le PDL (Tab. 32). A la fin du procédé de production la biomasse est centrifugée et la DCO du surnageant à éliminer est mesurée. A la fin de la phase Batch, la DCO du surnageant a été réduite de 90% avec une valeur de DCO de 3,6 g/L. De façon similaire à la fin du procédé en continu à haute densité cellulaire, la DCO du surnageant est réduite de 91%. Le milieu d'alimentation concentrée à 300 g/L du chémostat passe d'une DCO 331,5 g/L de charges polluantes à 28,5 g/L.

5. Conclusions sur le potentiel nutritionnel de *G. sulphuraria*

Le procédé de production développé au cours de cette étude permet de proposer une nouvelle source de protéines avec des propriétés nutritionnelles intéressante respectant les normes de sécurité alimentaire tout en proposant une solution aux problématiques d'effluents dans les secteurs industriels laitiers.

La souche de *G. sulphuraria* FCC 3432 a des propriétés nutritionnelles lui permettant d'entrer sur le marché des compléments alimentaire grâce à sa teneur élevée en protéines (48%), sa composition en acides aminés essentiels et de sa digestibilité. Cette biomasse est également source de riboflavine, d'acide folique, de fer et de manganèse. La biomasse a une activité antioxydante quantifiée *in vitro* à 439 μmol Trolox/g_{MS}. Des tests sur des animaux devront être réalisés sur des animaux afin de valider l'effet antioxydant *in vivo,* avant de réaliser des essais cliniques si ceux-là s'avèrent positifs.

V. DISCUSSION

V. Discussion

A. Une souche versatile et productrice de phycocyanine

La souche de *G. sulphuraria* est connue comme étant une espèce capable de s'adapter à son environnement en ayant l'aptitude de croître en présence ou absence de lumière, sur une cinquantaine de substrats carbonés (Gross and Schnarrenberger, 1995; Oesterhelt et al., 1999; Weber et al., 2004), en conditions de culture extrêmes en résistant à des températures élevées et même à des chocs violents de températures (Rossoni et al., 2018), en résistant à de fortes salinités et à la présence de métaux lourds (Ju et al., 2016; Minoda et al., 2015) et en s'adaptant à un environnement complexe tel que l'eau des déchets urbains (Henkanatte-Gedera et al., 2017), des déchets alimentaires (Sloth et al., 2017) ou des coproduits de l'industrie laitière tel que les lactosérums doux, acides ou les perméats de lactosérum et de lait (Cagnac et al., 2017a).

Les perméats de lait ou de lactosérum résultant des procédés de production de l'industrie laitière contiennent du lactose et des minéraux ainsi ces coproduits peu valorisables peuvent être utilisés comme substrat de fermentation.

1. Effet du Permeat de lait sur la pigmentation :

Le PDL est un substrat complexe, et lors des premiers essais sur ce milieu, la souche sauvage *G. sulphuraria* UTEX2919 n'avait pas la capacité de produire de la C-PC en présence ou absence de lumière, contrairement à ce qui a été décrit sur d'autres substrats comme le glucose ou le glycérol (Sloth et al., 2006 ; Graverholt and Eriksen 2007 ; Schwerna 2015).
Certains constituants du PDL sont responsables de cette inhibition de la pigmentation. Il a été clairement mis en évidence que le lactose, principale source de carbone du PDL, n'inhibé pas la pigmentation mais qu'il y avait d'autres éléments qui pouvaient être mis en cause. En effet, la forte production de C-PC sur un milieu contenant du lactose pur de 60,5 mg/g_{MS} contre 1,84 mg/g_{MS} sur PDL (Fig. 21), nous a démontré que la répression ne provenait pas de cette source carbonée.
Après des analyses de la composition du PDL, nous avons mis en évidence que plusieurs éléments pouvant potentiellement impacter la production de C-PC. Ces analyses ont révélé la présence de fortes concentrations de phosphore (171 mg/L), calcium (167 mg/L), potassium (637 mg/L) et sodium (268 mg/L) dans un milieu contenant 30 g/L de PDL (Tab. 10).
Nous savions que le phosphore était un élément critique pouvant influencer la production de C-PC d'après le dépôt d'un brevet Fermentalg en 2015 et une publication en 2017 (Cagnac et al., 2017), ces données sont soutenues par la publication Wan et al., (2016b). Ces publications affirment que la teneur en C-PC intracellulaire est réduite en présence d'une concentration en phosphate supérieure à 350 mg/L ce qui correspond à 113 mg/L de phosphore. Il n'y a pas d'implication du phosphate connue dans le métabolisme de la voie de biosynthèse de la C-PC ou de la chlorophylle mais cet élément pourrait avoir des interactions avec le transport d'électrons au niveau de la chaîne photosynthétique du phytoplancton et notamment au niveau du PSI (Filstrup and Downing, 2017). La concentration de phosphore dans le lait est comprise entre 0,9 et 1 g/L il n'est alors pas surprenant d'en retrouver dans les coproduits laitiers. Ainsi la teneur en phosphore présent dans le PDL utilisé pour le développement de notre procédé de production pourrait expliquer l'inhibition de la C-PC chez la souche sauvage UTEX2919 dans ce milieu de culture. L'effet du calcium, sodium et potassium a également été évalué sur des milieux chimiquement définis (partie IV-A-3-e), mais aucun de ces éléments n'a eu d'impact majeur sur la production de C-PC.
Les autres constituants majeurs du PDL sont les protéines, environ 4 g/L pour 30 g/L de PDL utilisé lors de ce travail. Même si une partie de ces protéines précipitent durant la stérilisation

du milieu en condition acide (pH 3), il n'est pas exclu qu'une partie de celles-ci soient hydrolysée et génère la libération d'acides aminés ou de petits peptides. En réalisant des expériences en présence de plusieurs concentrations en peptone de caséine, nous avons pu démontrer qu'au-delà de 1 g/L de peptone de caséine dans le milieu de culture, la pigmentation était fortement affectée (Annexe 2).

2. Effet du permeat de lait sur la croissance en hétérotrophie et en mixotrophie :

Lors des premiers essais une différence de croissance a été observée entre la souche sauvage UTEX2919 cultivée en mixotrophie et en hétérotrophie. La lumière avait un effet positif sur la multiplication cellulaire et ce phénomène n'avait pas été remarqué sur d'autres sources de carbone organique. Suite aux repiquages successifs de la souche sauvage UTEX2919 en milieu liquide sur PDL pendant des mois, celle-ci a fini par s'adapter à son environnement complexe et à croître en mixotrophie comme en hétérotrophie avec les mêmes performances de croissance (μ_{moyen}= 0,025 h^{-1}) (Fig. 23). Cette « acclimatation » de la souche sauvage a abouti à l'acquisition de l'aptitude à produire de la C-PC en mixotrophie dans cette condition de culture (13mg/g_{MS}). L'étude différentielle d'expression des gènes confirme ces observations. En effet, l'analyse de l'expression des gènes qui a été réalisée après l'acclimatation de la souche UTEX2919 au milieu PDL, montre que la plupart des gènes surexprimés en condition mixotrophie par rapport à l'hétérotrophie sont essentiellement liés au métabolisme de la synthèse de la C-PC et de la photosynthèse, tels que les gènes codant pour les sous-unités α et β de la C-PC, la sous-unité O du PSI, les polypeptides linker et certains complexes protéiques collecteurs de lumière. La différence d'expression des gènes entre la condition en mixotrophie et hétérotrophie n'est pas très importante (6%), les gènes les plus surexprimés codent pour une protéine heat shock et un transporteur de phosphate et sont surexprimés 13 fois en hétérotrophie (Partie IV-C-2-a). D'autres différences d'expression identifiées comme significatives sont observées notamment au niveau de gènes codant pour des transporteurs de sucre mais le facteur de surexpression est relativement faible (entre 6 et 3) (Tab. 23).

3. Sélection de variants adaptés au PDL :

En parallèle de l'adaptation de la souche UTEX2919 par repiquage en milieu liquide, des variants ayant l'aptitude de pigmenter à l'obscurité ont été sélectionnés en milieu solide comme cela avait été fait par le passé sur du glucose (Gross and Schnarrenberger, 1995). Les colonies ont été isolées et mises en culture liquide et c'est ainsi que nous avons identifié successivement la souche FCC3222, puis la souche FCC3432. La première souche FCC3222 a la capacité de produire 15 mg/g_{MS} de C-PC en mixotrophie et 5mg/g_{MS} en hétérotrophie. La seconde souche FCC3432 est capable de produire 30 mg/g_{MS} de C-PC en hétérotrophie, c'est à dire plus de C-PC que la FCC3222 en mixotrophie. Les cellules de *G. sulphuraria* sélectionnées de cette manière ont une croissance similaire en hétérotrophie et mixotrophie et sont adaptées aux composés du milieu PDL. La production de C-PC est moins réprimée par les éléments inévitables des coproduits laitiers (le phosphore et les protéines résiduelles) que la souche sauvage. Aucune différence d'expression de gènes liés au transport de phosphate n'a été identifiée pour les conditions sur PDL et la présence de protéines dans ce milieu de culture n'a pas provoqué la surexpression de gènes codant pour des transporteurs d'acides aminés ou de peptides chez les souches cultivées en milieu PDL. De façon surprenante et inexpliquée la seule variation d'expression de transporteurs d'acide aminés a été identifiée lors de la culture de la souche UTEX2919 sur le milieu Glycérol. Le milieu glycérol est un milieu chimiquement défini sans azote organique contrairement au PDL. Nous aurions pu penser que la présence de peptides

et/ou d'acides aminés pouvant se retrouver dans le milieu PDL allaient engendrer la surexpression de transporteurs d'acides aminés, mais ce qui n'est pas le cas.

4. Étude de l'expression différentielle des gènes entre la souche sauvage et le variant :

a) Dérégulation des gènes liés à la biosynthèse de la C-PC

La souche variante FCC3432 a été sélectionnée pour sa capacité à produire de la C-PC en hétérotrophie. En comparant l'expression des gènes de ce variant avec ceux de la souche sauvage incapable de produire de la C-PC en hétérotrophie nous avions pour objectif d'identifier les gènes de la voie de biosynthèse de la C-PC probablement dérégulés pour FCC3432.
Conformément à nos attentes, les gènes liés à la synthèse de la C-PC surexprimés chez la souche sauvage en mixotrophie le sont également chez la souche variante FCC3432 en hétérotrophie. Cela confirme la dérégulation de ces gènes dans la souche FCC3432. Contrairement à ce que nous aurions pu penser, un seul gène d'enzyme pouvant avoir un rôle dans la voie de synthèse de la C-PC est surexprimé dans les conditions productrices de C-PC. Il s'agit d'une oxydoréductase (thréonine 3-dehydrogenase) pouvant intervenir dans le métabolisme de la glycine qui est à la base de la voie métabolique de la C-PC. Le gène codant pour cette enzyme est surexprimé 116 fois chez la souche FCC3432 en hétérotrophie et 12 fois chez la souche sauvage cultivée en mixotrophie sur PDL par rapport à cette dernière cultivée en hétérotrophie.

La synthèse du précurseur de la voie métabolique de la C-PC, l'acide aminolévulinique synthétisé à partir de la glycine et du succinyl-CoA, est connue pour être induite par la lumière (Stadnichuk et al., 1998). L'enzyme 5-aminolévulinate synthétase n'a pas clairement été identifiée dans la liste des gènes de la souche UTEX2919 lors de l'analyse fonctionnelle et en recherchant dans la base de données NCBI NR nous avons constaté que cette enzyme n'est pas identifiée chez l'espèce *G. sulphuraria*. Afin d'identifier les gènes de la souche UTEX2919 pouvant être impliqués dans la synthèse de cette enzyme nous avons réalisé un blast de la séquence nucléotidique d'un gène codant pour une aminolevulinate synthétase de *Schizosaccharomyces pombe* sur les gènes de la souche UTEX2919. Deux gènes qui montrent un assez fort pourcentage d'identité (40% et 50%) avaient été identifiés comme des glycine-C-acétyltransférases de *Galdieria sulphuraria* suite à l'annotation fonctionnelle des gènes de la souche UTEX2919 car ils avaient un pourcentage d'identité à 90,39%. L'activité de cette enzyme est de catalyser la réaction entre l'acétyl-CoA et la glycine pour former de l'amino-3-oxobutanoate métabolite présent chez l'homme et *S. cerevisae* (National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. 2-Amino-3-ketobutyric acid, CID=440033, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/440033 (accessed on May 1, 2019). Or l'enzyme 5-aminolévulinate synthétase catalyse la réaction succinyl-CoA+glycine mais le succinyl-CoA et l'Acetyl-CoA peuvent tous les deux provenir de la dégradation de l'isoleucine (Schowen, 1993). De plus parmi les gènes identifiés lors du blast de ces deux gènes sur la base de donnée NR du NCBI, il y a le gène de la 5-aminolevulinate synthase de *Hondaea fermentalgiana* avec 68,97% et 45,71% d'identité et une *e-value* de $7e^{-115}$ et $1e^{-98}$, cet organisme est un nouveau genre de Traustochydrides (Dellero et al., 2018). Ainsi nous pouvant penser que l'annotation de ces gènes n'est pas correcte et qu'en réalité ces gènes ne codent pas pour une enzyme C-acetyltransférase mais bien pour une synthase de l'acide aminolévulinique. Néanmoins aucune différence d'expression de ces gènes n'existe entre les conditions étudiées lors de ce travail.

V. Discussion

Les gènes décrits dans la littérature comme étant induits par la lumière tels que la ferrochelatase et l'hème oxygénase (Rhie and Beale 1994) n'ont pas été surexprimés dans la condition mixotrophe.

En revanche, la surexpression de la thréonine-3-déshydrogenase en présence de lumière et dans la souche variante nous amène à penser que cette étape serait l'étape limitante de la voie métabolique en étant induite en présence de lumière. Ce ne serait pas le passage de la glycine vers 5-aminolevulinate qui serait induit par la lumière mais la formation de la glycine. Ceci pourrait être démontré en réalisant des expériences similaires à celles de Rhie and Beale (1994) permettant de comparer si la formation de biliverdine IXα est la même dans des cellules cultivées à l'obscurité en présence d'alanine ou de thréonine.

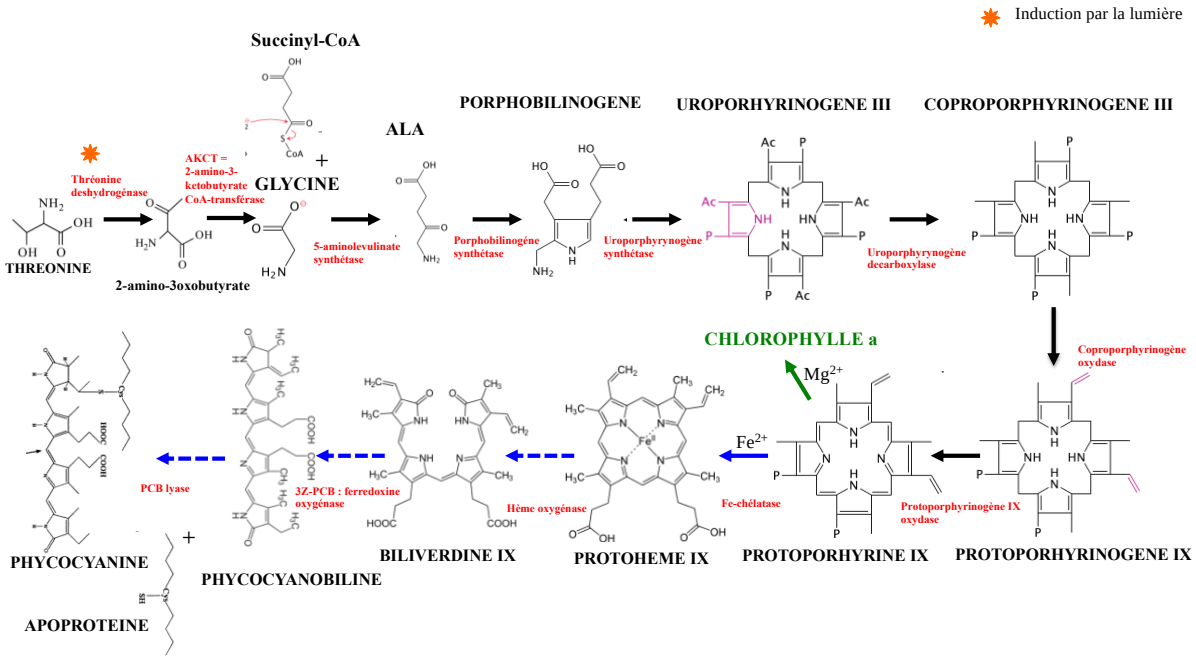


Figure 62. Adaptation de la voie de biosynthèse de la C-PC à partir de nos résultats et des données de Foley et al., 1982 ; Brown et al., 1982 ; Troxler et al., 1989 ; Rhie and Beale, 1994 ; Stadnichuck et al., 1998

b) Dérégulation de gènes de transporteurs de sucres

Certains gènes codant pour des transporteurs de sucre sont différemment exprimés chez la souche variante FCC3432 comparé à la souche sauvage UTEX2919 sur PDL. Notamment 3 gènes (N°529, 1096, 2838) qui ne sont pas ou quasiment pas surexprimés chez la souche FCC3432 cultivée sur PDL par rapport à la condition sur glycérol alors qu'ils le sont chez la souche UTEX2919 (Fig. 59). Cela nous laisse imaginer que ces transporteurs ne sont pas essentiels à l'absorption du lactose spécifiquement chez cette espèce microalgale. Pour l'ensemble des conditions sur PDL deux gènes sont largement surexprimés par rapport à la condition sur glycérol N°801, et N°4011). Le gène 4011 est notamment surexprimé 624 X (FCC3432), 418X (UTEX2919 en mixotrophie) et 121X (UTEX2919 en hétérotrophie). Ce gène pourrait coder pour un transporteur de lactose.

5. Adaptation et induction du métabolisme en fonction du substrat carboné :

G. sulphuraria a des compétences de résistance et d'adaptation reconnue mais peut nécessiter un temps d'adaptation lors d'un changement d'environnement, elle a par exemple fini par s'habituer et croître sur un milieu composé de déchets urbains après 5 à 7 jours de culture

(Henkanatte-Gedera et al., 2017). Un temps d'acclimatation peut également être nécessaire lors du passage de l'autotrophie vers l'hétérotrophie pouvant durer entre 1 à 45h en fonction de la source carbonée utilisée. Ce temps de latence est certainement due à l'induction du système d'absorption du substrat (Gross and Schnarrenberger, 1995; Oesterhelt et al., 1999). Bien que la souche utilisée dans les travaux de recherche cités ci-dessus aient été réalisés avec une souche différente de la nôtre, nous avons pu constater que ce temps de latence existait également lors du changement de source carbonée, en passant du glycérol vers le lactose. Lors des premiers essais sur la souche sauvage UTEX2919 nous avons réalisé l'importance d'utiliser le même substrat pour des pré-cultures et les cultures de l'essai, afin d'éviter les longues phases de latence notamment lors d'une culture sur PDL (lactose). La phase de latence de cette souche lors du passage d'un milieu glycérol vers un milieu PDL est comprise entre 4 et 6 jours. Un temps de transition est également mis en évidence lors des cultures sur le mélange de sucre glycérol-lactose où un temps de latence est observé entre la consommation du glycérol et celle du lactose (Fig. 39) Ces observations sont supportées par les résultats obtenus avec les substrats radiomarqués (Fig. 47– Annexe 3). Lors de ces essais nous avons pu constater que l'absorption du lactose dans les cellules cultivées sur glycérol était nulle durant les 4 heures d'incubation, alors que pour les cellules cultivées en PDL le transport du lactose était mesurable dès les premières minutes de l'essai (Fig. 47A). D'après ces résultats il apparaît clairement que la première étape critique à l'utilisation du lactose comme substrat carboné est liée à son absorption par la cellule.

B. Identification et caractérisation biochimique du système de transport de lactose chez *Galdieria sulphuraria*.

1. Identification génétique du système de transport du lactose

L'analyse du génome UTEX 2919 a permis d'identifier 48 transporteurs de sucres de type MFS. Les transporteurs de la superfamille MFS sont ubiquitaires, ils contiennent entre 400 et 600 acides aminés et 12, 14 ou 24 hélices a transmembranaires (Reddy et al., 2012). Un transport actif de lactose décrit dans la littérature est celui *E. coli* qui possède un transporteur appartenant à la superfamille des MFS et qui est un symport : lactose/H+. Cette perméase au lactose, qui est codée par le gène *LacY*, contient 417 acides aminés, 12 segments transmembranaires. La valeur de *Km* du système de transport du lactose de cet organisme est de 1mM avec une *Vmax* de 399,5 nmol lactose/min/mg de protéine (Green et al., 2000).
Malgré, des recherches d'homologies entre les séquences de transporteurs de lactose de bactéries, levures et des analyses phylogénétiques. Nous n'avons pas pu identifier dans le génome de *Galdieria sulphuraria* des gènes pouvant coder spécifiquement pour des transporteurs de lactose. Cela peut s'expliquer par d'importantes divergences phylogénétiques entre les séquences des transporteurs de sucre de ce microorganisme et celles d'autres espèces.

Nous avons vu précédemment, qu'un temps d'adaptation de plusieurs heures sur PDL était nécessaire pour qu'une souche non adaptée ait la capacité d'absorber le lactose. Il semble logique que ce temps de latence soit lié à l'induction du ou des systèmes de transport du lactose. Ce même phénomène d'induction est retrouvé chez la souche *Aspergillus nidulans*, lors d'un transfert d'un milieu contenant du glycérol vers un milieu lactose où aucune absorption n'est mesurée au cours des 60 premières heures. Ce temps correspond au temps d'induction des gènes codant pour une β-galactosidase intracellulaire (bgaD) et pour une lactose perméase (lacpA) appartenant à la famille des MFS, ces gènes sont réprimés en présence de glycérol et de glucose (Kulcsár et al., 2016). Comme nous observons le même comportement chez *G. sulphuraria*

nous pouvons penser que tout comme chez *Aspergillus* cette souche pourrait avoir un système de transport de lactose réprimé en présence de glucose et glycérol donc nous avons donc émis l'hypothèse que nous pourrions identifier ce(s) transporteur(s) grâce à l'étude différentielle d'expression des gènes entre la condition de culture sur glycérol et celle sur lactose.
Les cultures en continu nous ont permis d'avoir un système de production stable au niveau de la concentration en substrat et de la composition de la biomasse afin de pouvoir corréler les variations d'expression de gènes aux seuls paramètres substrat et lumière.

L'étude différentielle d'expression des gènes a permis d'identifier une différence d'expression de nombreux gènes (22,22% des gènes) entre une culture réalisée sur un milieux glycérol ou sur milieu PDL et notamment des gènes liés au métabolisme carboné. L'ensemble de ces essais prouve l'existence d'un système de transport du lactose différent de celui du glycérol et nécessitant un temps d'induction pour la mise en place du système d'absorption ou d'une voie métabolique pour le nouveau substrat.
Parmi les 16 gènes surexprimés plus de 10 fois entre la condition sur PDL et celle sur glycérol, 13 gènes codent pour des transporteurs de sucres ou des enzymes du métabolisme carboné. Dans la condition PDL, 7 gènes de la souche UTEX2919 codant pour des symporteurs de sucre/H^+ (N°1096, 4011, 2838, 432, 5372, 687, 5410) sont surexprimés plus de 5 fois par rapport à la condition sur glycérol (Tab. 24, Fig. 60). Dans la condition sur glycérol deux gènes codant pour des symporteurs sucres/H^+ sont surexprimés par rapport à la condition sur PDL : N°3727 (x88) et N°3690 (x31) ainsi que deux gènes codant pour des aquaglycéroporines N°1768 (x41) et N°3217 (x5). Tous les gènes codant pour les transporteurs de sucres identifiés sont annotés comme étant des symporteurs sucre/H^+ mais leur spécificité et leurs mécanismes de transport restent à démontrer.

2. Identification biochimique des systèmes de transport

Plusieurs études de transport de substrats ont déjà été réalisées chez *Galdieria sulphuraria* (Oesterhelt et al., 1999; Oesterhelt and Gross, 2002). Cela a permis de caractériser les systèmes de transport de plusieurs sources carbonées telles que le glucose, fructose, fucose et mannose. A notre connaissance, le transport de glycérol et le lactose n'ont jamais été étudiés. La souche UTEX2919 ou bien les souches variantes FCC3222 et FCC3432 ont la capacité de se développer aussi bien sur un milieu contenant du glycérol, du lactose, du glucose ou du galactose comme substrat, nous avons fait le choix de travailler avec la souche FCC3222 car c'est la souche modèle choisie pour le développement du procédé de production sur les coproduits laitiers.

Lors des suivis de consommation de sucres dans les surnageants par les dosages à l'HPLC aucune concentration de glucose ou de galactose n'a été détectée, nous laissant penser que le lactose n'était pas hydrolysé avant d'être absorbé comme c'est le cas pour la microalgue *Scenedesmus sp* (Borges et al., 2016; Bentahar, 2018).

a) Système de transport de lactose :

La caractérisation biochimique du transport de lactose n'a pas été facile à établir car le système de transport n'a pas pu être saturé même avec de fortes concentrations en lactose dans le milieu réactionnel. Malgré cela, les cinétiques d'absorption suggèrent deux systèmes de transport de lactose. Le premier système a une faible affinité pour le lactose (*Km*=15-19 mM) et le second une très faible affinité (*Km*=254-346 mM) pour des cellules habituées à consommer ce substrat. Par comparaison, le système de transport du lactose chez *E. Coli* est à haute affinité avec une

affinité pour ce substrat 15 à 20 fois supérieure (*Km*=1mM) à celle de *G. sulphuraria* (Green et al., 2000)
La vitesse maximale *Vmax* d'absorption du lactose pour les cellules non induites est 15 à 20 fois plus faible que pour les cellules induites pour le système de transport ayant la plus haute affinité (*Vmax*MPDL= 0,25nmoles/mg_{MS}/min ; *Vmax*HPDL=0,36 nmoles/mg_{MS}/min ; *Vmax*MGLY=0,02 nmoles/mg_{MS}/min). L'affinité pour le lactose est statistiquement identique que les cellules aient été induites ou non par ce substrat. Cette observation suggère que le système de transport du lactose de *G. sulphuraria* pourrait être présent dans les cellules non induites et qu'en présence de lactose dans le milieu, une surexpression des gènes codant pour des transporteurs de lactose permettrait une augmentation du nombre de transporteurs adressés à la membrane plasmique. Cela pourrait expliquer les différences observées au niveau de la vitesse d'absorption *Vmax* et la similitude des *Km* mesurées.

Pour le second système d'absorption du lactose, l'affinité déterminée est extrêmement faible même pour les cellules induites par la présence de lactose. Les concentrations en lactose utilisées lors de cette étude étant élevées, un fort gradient de concentration membranaire doit être présent de part et d'autre de la membrane plasmique ce qui pourrait conduire au transport du lactose par un processus de diffusion. Ce qui pourrait expliquer la très faible absorption de lactose par les cellules non induites (MGLY). Il est à noter que ce second système n'est défini uniquement que pour les fortes concentrations de lactose (>50mM) est reste donc incertain. Toutefois, nous avons soustrait les valeurs d'absorption de lactose mesurées pour cette condition (MGLY) aux valeurs des conditions MPDL et HPDL afin d'observer uniquement l'absorption en fonction de la concentration en lactose par le premier système à plus forte affinité mais cette action n'a pas modifié l'allure de la courbe d'absorption du lactose qui est restée linéaire et non saturable. Des processus de transport de solutés non saturables ont déjà été décrits pour des cellules de différents organismes. Ces processus impliquent des mécanismes variés tels que la simple diffusion, des transporteurs à très faible affinité, des canaux ou des processus d'endocytose. Dans des cellules d'Olivier, l'absorption du glucose est saturable pour des concentrations inférieures à 0,5 mM et insaturable pour des concentrations de 2 à 10 mM. Pour les fortes concentrations en glucose, l'absorption par diffusion facilitée met en jeu un canal sensible au $HgCl_2$ (Conde et al., 2007). Trois transporteurs de saccharose isolés dans les téguments de graines de Pois (PsSUF1 et PsSUF4) et de Fève (PvSUF1) sont peu saturables, insensibles au pH et au CCCP et présentent une faible affinité pour le saccharose avec de fortes valeurs de Km (PvSUF1 = 27mM, PsSUT4 = 37mM et PsSUF1=99mM) (Zhou et al., 2007)(Zhou et al., 2007). L'absorption du lactose par les cellules de *G. sulphuraria* est donc un processus inductible par le lactose et non saturable. Ces résultats suggèrent que le transport du lactose se réalise dans le sens de son gradient de concentration par diffusion facilitée. Le gradient de concentration pouvant être maintenu grâce à une rapide consommation du lactose à l'intérieur de la cellule ce qui nécessite l'activation d'une voie métabolique du lactose potentiellement *via* l'induction de β-galactosidases pouvant être codées par les gènes 528, 575 et 2801, tous les trois induits en présence de PDL.

b) Système de transport du glycérol

Dans le génome de la souche UTEX2919, 2 gènes ont été identifiés comme étant des aquaglycéroporines (N° 1768 et N° 3247) tout comme ce qui avait été décrit par Barbier 2005. Les aquaglycéroporines sont des canaux et ne sont pas dépendant énergétiquement (Hénin et al. 2008 ; Chen 2010) et pourtant l'absorption du glycérol par les cellules de *G. sulphuraria* est saturable et inhibée à 83% par le CCCP, ce qui suggère que le système de transport mesuré est dépendant du gradient de protons et donc vraisemblablement un symporteur glycérol/H^+. La

surexpression de symporteurs de sucre/H+ de la famille des MFS (N°3727 et N° 3690) a également été identifiée dans la condition HGLY. Si ces transporteurs sont réellement des symporteurs sucre/H+ ils pourraient être responsable de l'absorption du glycérol mesurée dans nos conditions de culture. Le glycérol pourrait donc être transporté par deux systèmes distincts chez *G. sulphuraria*, même si cela n'est pas observé sur les courbes de cinétique d'absorption de ce sucre. La diffusion directe à travers la membrane est également possible pour les molécules liposolubles comme le glycérol (Eze and McElhaney, 1981) mais cette diffusion passive permet généralement d'absorber une quantité de substrat beaucoup plus faible qu'avec une diffusion facilitée par une protéine membranaire.
En regardant les transporteurs de glycérol chez d'autres organismes, nous constatons que de nombreux champignons et de levures possèdent un transport actif du glycérol comme *Debaryomyces hansenii, Candida albicans (Ferreira et al., 2005).* D'autres ont des séquences codantes pour une protéine présentant une identité de 71% avec le symporter glycérol/H^+ de *S. cerevisiae* comme *K. marxianus* et *K. lactis.* L'activité de transport du glycérol à travers les membranes plasmiques chez les plantes est réalisée par des aquaporines qui effectuent une diffusion facilitée et sont étroitement apparentés à la perméase au glycérol d'*E. Coli* (Ferreira et al., 2005). La souche *G. sulphuraria* pourrait alors détenir des systèmes de transport actif du glycérol (codés par les gènes N°3690 et N°3727) comme ceux présents chez certaines levures ou champignons tout en ayant un système passif représenté par des aquaglycéroporines 5codées par les gènes N°1768 et N°3247) provenant de transferts horizontaux de gènes bactériens (Qiu et al., 2013).

c) Système de transport de glucose

L'étude de caractérisation du système de transport du glucose a mis en évidence l'existence de deux systèmes de transport du glucose, un ayant une plus forte affinité (0,08-0,27mM) que l'autre (3,17-4,54mM) pour ce substrat. Le *Km* de la souche *G. sulphuraria* indonésienne mesuré (Oesterhelt et al., 1999) correspond au système de haute affinité avec une valeur de 0,14mM.
Les cellules ayant été cultivées sur un milieu contenant du lactose (MPDL et HPDL) ont absorbé le glucose avec une vitesse maximale *Vmax* d'absorption significativement supérieure aux cellules cultivées sur glycérol (MGLY) et cela pour les deux systèmes de transport. Le glucose étant un compétiteur du système de transport du lactose et dépendant du gradient électrochimique de protons nous aurions pu penser que, le lactose et le glucose étaient transportés par un seul et même système de transport. Cette hypothèse n'a pas été confirmée car les cellules cultivées sur un milieu glucose ont un temps de latence similaire à celui des cellules cultivées sur glycérol lorsqu'elles sont transvasées sur un milieu PDL. Un temps d'induction du métabolisme du lactose est donc nécessaire pour ces cellules détenant le système de transport du glucose.

d) Système de transport du galactose

Les faibles mesures d'absorption du galactose n'ont pas permis de caractériser réellement le système de transport du galactose. Ce système semblerait être de faible affinité à la vue des résultats obtenus lors du suivi de son absorption qui ont le même ordre de grandeur que ceux de l'absorption du lactose.
Étant un compétiteur du lactose, le galactose pourrait également utiliser le même système de transport. Le système de transport du galactose semble être un système dépendant du gradient de protons, puisqu'il est inhibé par le CCCP.
Ces résultats renforcent l'idée que le système de transport est propre au lactose et que celui-ci n'est pas hydrolysé avant d'être transporté dans la cellule. En effet, le lactose utilisé lors du suivi d'absorption était radiomarqué sur les carbones appartenant à la molécule de glucose. S'il

y avait eu une hydrolyse de ce disaccharide en glucose* et galactose préalablement au passage membranaire, la cinétique d'absorption du lactose aurait dû être similaires à celle du glucose, ce qui n'a pas été le cas (Fig. 47D, 50D).

e) Modèle du système de transport de sucres

En croissant les données, physiologiques, biochimiques, et moléculaires nous sommes arrivés à concevoir un modèle hypothétique du système de transport de Lactose et de sa régulation chez *Galdieria sulphuraria* (Fig. 63, 64) :

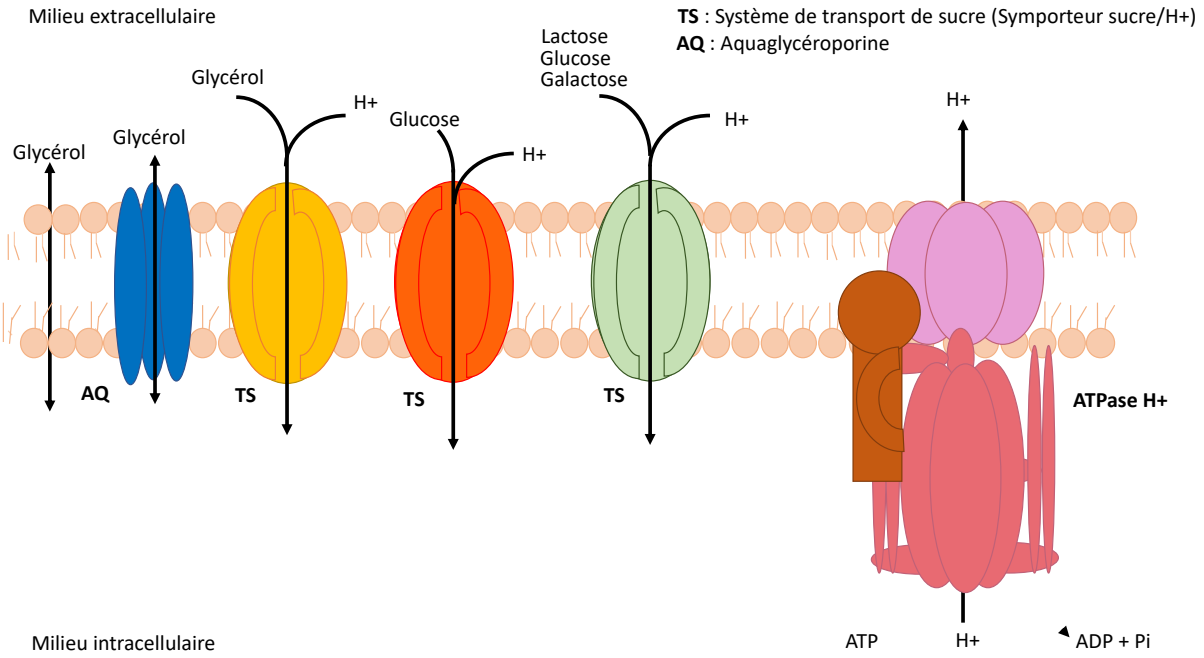


Figure 63. Schéma du système de transport de sucre hypothétique de la souche G. sulphuraria

Sur un milieu glycérol les gènes codant pour les aquaglycéroporines (N°1768 et N°3247) et les deux transporteurs sucre/H^+ (N°3690 et N°3727) sont surexprimés et les protéines correspondantes permettent de catalyser l'entrée du glycérol dans la cellule. Bien que la souche n'ait pas la capacité de transporter le lactose en présence de glycérol nous pouvons toutefois noter qu'il existe un niveau basal d'expression des gènes de transporteurs de sucre/H^+ codant pour les transporteurs identifiés comme étant les transporteurs de lactose potentiels (N°4011 et 801).

La première hypothèse consiste à dire que les ARNm de ces gènes ne sont pas traduits en protéines pour des raisons de mécanisme de régulation post-transcriptionnelle ou à cause du faible niveau de transcrits. Cette hypothèse expliquerait l'absence de transport lors des essais d'absorption de lactose radiomarqué par des cellules non induites (condition MGLY Fig. 47). La seconde hypothèse serait d'imaginer que les transporteurs permettant le transfert de lactose soient présents au niveau de la membrane plasmique de manière constitutive comme le mentionne Oestherhelt, (1999) mais en nombre insuffisant pour qu'une activité soit détectable par notre méthode d'analyse. La présence de ces transporteurs permettrait le passage d'une petite quantité de lactose à l'intérieur de la cellule qui induirait une cascade de signalisation permettant la surexpression des gènes codant pour le système de transport du lactose et les enzymes de son catabolisme, telles que les β-galactosidases. Cette cascade de signalisation serait elle-même réprimée en présence d'autres substrats comme le glycérol ou le glucose,

expliquant ainsi les phénomènes d'accumulation de lactose sur les essais sur un mélange de substrat (Glycérol-PDL) (Fig. 39).

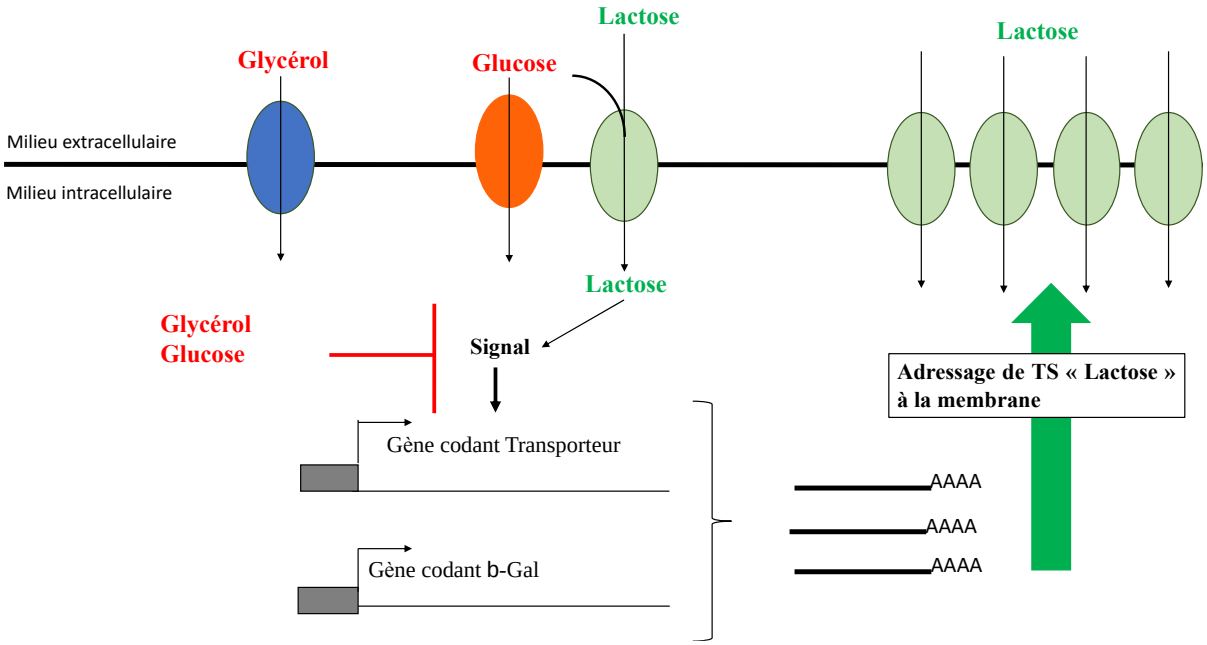


Figure 64. Schéma hypothétique de la régulation du système d'absorption de lactose chez G. sulphuraria

C. Notre procédé de production et les procédés existants

1. Procédés de production utilisant les coproduits laitiers :

Le développement de ce procédé de production avait pour objectif principal de proposer un système de production de protéines microalgales industrialisable en utilisant les coproduits laitiers comme substrat, avec des performances de production en biomasse et protéines élevées. Certains procédés de production exploitant des coproduits de l'industrie laitière ont été étudiés et développés. Deux pratiques d'utilisation de ces jus lactés comme substrat de fermentation sont identifiées, la première étant de les utiliser sans prétraitement en utilisant des organismes capables de consommer le lactose et la deuxième étant de pré-hydrolyser le lactose en glucose et galactose pour pouvoir élargir la gamme d'organismes pouvant intégrer ce procédé de production. De nombreuses bactéries ont la faculté de consommer le lactose comme les bactéries lactiques *Lactobacillus* (*brevis*, *plantarum*, *fermentum*) ou *E. Coli*, *Arthrobacter* (Khanafari et al., 2006) mais peu d'eucaryotes. Certaines levures comme *Kluyveromyces* (*Lactis*, *marxianus*) ou *Candida* (*pseudotropicalis*, *krusei*) (Malige, 1982; Virgnaud, 1960; Yadav et al., 2014) et quelques champignons filamenteux tel que *Aspergillus* (*niger*, *oryzae*) utilisent le lactose comme source de carbone organique, enfin selon nos connaissances aucune souche microalgale ne serait capable d'absorber directement le lactose. La souche *Scenedesmus obliquus* réaliserait une hydrolyse extracellulaire du lactose lors d'une culture sur perméat de lactosérum grâce à son activité β-galactosidase (Bergeron Girard, 2014; Delrue et al., 2016; Tian-Yuan et al., 2014). Les bactéries malgré leur fort taux de croissance cellulaire ne sont pas utilisées en tant que protéine unicellulaire (POU) car leur taux d'acides nucléiques est élevé (8-12%) et que nombreuses d'entre elles produisent des endotoxines (Ritala et al., 2017).

V. Discussion

Un comparatif des procédés de production utilisant les coproduits de l'industrie est présenté ci-dessous.

Tableau 33. Bilan des procédés de production de protéines unicellulaires utilisant les coproduits lactés

Souche et Référence	Type de coproduits lactés	MS (g/L)	μ (h^{-1})	r_{MS} (g/L/h)	R_{MSL} (g_{MS}/g_L)	R_P (g/gMS)
Saccharomyces lactis, S. fragilis, Candida pseudo tropicalis (Brevet Fromageries Bel)	Sérum dé-protéiné	65-95				48-52
S. cerevisiae Candida tropicalis (Brevet Fromagerie Bel)	Lactosérum dé-protéiné (Multiétagé)		0,38 0,35			
Candida, K. fragilis (Brevet Fromagerie Bel)	Lactosérum dé-protéiné (Multiétagé)	20 30	0,55 0,52			
K. fragilis, T. sphaerica, T. bovina (Moulin *et al.*, 1983)	Lactosérum dé-protéiné (continu)	13,3	0,33	4,4		55
K. marxianus (Yadav 2014)	Lactosérum de fromage (Batch)		0,21	0,15		
K. marxianus (Schultz 2006)	Lactosérum de fromage Dé-protéiné (Fed-Batch)	50-65			0,52	
K. lactis (Sampaio 2016)	Lactosérum dé-protéiné			2,29		
K. marxianus (Lukondeh et al., 2005)	Poudre de lactose dé-protéiné (Fed-batch)	105		2,9	0,38	
K. marxianus (Yadav *et al.*, 2014)	Lactosérum de fromage dé-protéiné (Continu)	13	0,02	0,26	0,19	
Aspergillus niger (El-Samragy 1996)	Lactosérum	18,5				
Scenedesmus obliquus (Girard et al., 2014)	Perméat de lactosérum (Mixotrophie)	3,6		0,011		

(Bergeron Girard, 2014; Coelho Sampaio et al., 2016; El-Samragy et al., 1996; Lukondeh et al., 2005; Malige, 1982; Moulin et al., 1983; Schultz et al., 2006; Singh Yadav, 2014; Virgnaud, 1960)

Les taux de croissance et la consommation directe du lactose par les souches de levure de l'espèce *Kluyveromyces* permettent d'obtenir les meilleures performances de croissance et de production de protéines sur les coproduits laitiers (μ entre 0,2 et 0,5h^{-1}). Les fromageries Bel l'avaient bien compris en déposant des brevets sur ce sujet dès les années 1960 (Virgnaud, 1960), cependant dans ce type de procédé l'apport d'oxygène n'est pas suffisant pour éviter l'effet Crabtree lorsque de forte densité cellulaire sont atteintes, ce qui provoque le basculement vers le métabolisme fermentaire et la production d'éthanol (Yadav, 2014). Les récents essais réalisés par Yadav (2014) sur un procédé de production en continu ont donné un rendement biomasse produite sur lactose consommé (r_{MSL}) de 0,19 g_{MS}/g_L avec une productivité en biomasse de 0,26 g/L/h aboutissant à une productivité en protéine de 0,13 g/L/h grâce à une teneur protéique de 50% de la masse sèche.

Le tableau 34 répertorie les performances obtenues lors des procédés de productions de *G. sulphuraria* sur PDL au cours de ces travaux. La souche FCC3222 utilisée pour la mise au point du procédé de production, a les mêmes productivités en biomasse et protéines que ce soit en mixotrophie ou en hétérotrophie. Cette souche cultivée en chémostat avec une alimentation en PDL concentrée à 75 g/L a les mêmes productivités en biomasse et protéines que la souche *Kluyveromyces* cultivée en continu par Yadav (2014). En utilisant, un procédé de production en continu la productivité de la biomasse r_{MS} FCC3222 en mixotrophie est passée de 0,08 à 0,3 g/L/h avec une multiplication par 5 de la productivité en protéines.
L'utilisation d'un PDL plus concentré (300 g/L) a permis d'atteindre des densités (90-110 g/L MS). La combinaison d'un mode de culture en continu avec de hautes densités cellulaires a permis d'augmenter considérablement les performances en productivité de biomasse et de protéines quel que soit la souche. La productivité maximale en protéines a été atteinte par la

souche UTEX2919 cultivée en mixotrophie : 0,6 g/L/h de protéines ce qui est 4,5 fois supérieur à la souche *Kluyveromyces* cultivée en continu sur du perméat de lactosérum.

Tableau 34. Bilan des performances globales des procédés de production réalisé dans ce travail

Souche	Type de culture	Durée de culture (h)	MSmax (g/L)	μ_{max} (h^{-1})	r_{MS} (g/L/h)	rL (g/L/h)	R_P (g/g)	r_P (g/L/h)	C-PC (mg/g)	r_{C-PC} (mg/L/h)
FCC3222	Mixotrophie Fed-Batch	284	23,56	0,022	0,08	0,22	0,34	0,03	7,93	0,66
FCC3222	Hétérotrophie Fed-Batch	329	28,5	0,02	0,09	0,2	0,39	0,03	2,52	0,23
FCC3222	Mixotrohie Chémostat	-	30	0,01	0,3	0,62	0,52	0,16	10	3,00
FCC3222	Mixotrophie Fed-Batch (avant maturation)	310	89	0,022	0,29	1	0,31	0,09	4,44	1,27
UTEX2919	Mixotrophie Chémostat	-	115	0,01	1,15	2,5	0,52	0,6	12	13,8
UTEX2919	Hétérotrophie Chémostat	-	100	0,01	1	2,2	0,48	0,48	0,8	0,8
FCC3432	Hétérotrophie Chémostat	-	100	0,01	1,05	2,4	0,46	0,46	30	30
FCC3432	Hétérotrophie Fed-Batch (100L)	200	76,6	0,022	0,38	0,79	0,48	0,18	35,7	13,7

Avec la souche FCC3432 en chémostat nous avons obtenu une productivité de 1g/L/h de biomasse et une productivité en protéines de 0,46 g/L/h deux fois supérieures à celle de la levure *Kluyveromyces* cultivée en continu sur du perméat de lactosérum (Singh Yadav, 2014).

2. Procédés de production de phycocyanine par G. sulphuraria :

La biomasse de *Galdieria sulphurara* se différencie des autres sources de protéines d'organisme unicellulaire par sa teneur intracellulaire en C-PC. Les productivités maximales en C-PC ont été obtenues avec la souche FCC3432 cultivée en chémostat en hétérotrophie permettant d'attendre 30 mg/L/h de C-PC. La production de cette souche en bioréacteur de type industriel (100L) en mode Fed-batch a permis de récolter une biomasse à 76,6 g/L contenant 35,7 mg/g_{MS} de C-PC qui est la teneur intracellulaire maximale atteint au cours de ces travaux.

Une synthèse des performances de croissance et de production en C-PC de *G. sulphuraria* trouvées dans la littérature est présentée ci-dessous.

Tableau 35. Cultures de Galdieria sulphuraria pour la production de C-PC

Souche	Substrat	Trophie	Type de culture	MS (g/L)	C-PC (mg/g)	µ (h^{-1})	rPC (mg/L/h)	Source
G. sulphuraria 074G	glucose	hétérotrophie	Chémostat	<1	9,7	0,04		Sloth et al., 2005
G. sulphuraria 074G	glucose	mixotrophie	Chémostat	<1	28,1	0,044		Sloth et al., 2005
G. sulphuraria 074G	glucose	hétérotrophie	FB	72	3,81	0,045	1,7-5,9	Schmidt et al., 2005
G. sulphuraria 074G	glucose	hétérotrophie	FB	109	26,7	0,025	19,7	Graverholt and Eriksen 2007
G. sulphuraria 074G	glucose	hétérotrophie	Chémostat	24,4-83,1	15,6	0,025	6,8-35,9	Graverholt and Eriksen 2007
G. sulphuraria 074G	Déchet alimentaire	hétérotrophie	Batch	3	28,9	0,033		Sloth et al., 2017
G. sulphuraria 074G	Déchet de boulangerie	hétérotrophie	Batch	3	20,9	0,025		Sloth et al., 2017
G. sulphuraria 074G	Glucose	hétérotrophie	Batch	2,4-2,4	25-30			Sorensen et al., 2013

V. Discussion

L'ensemble des cultures de *G. sulphuraria* présentées dans le tableau 35 et dans la littérature en règle générale sont réalisées avec la souche indonésienne 074G. Les performances obtenues par Graverholt and Eriksen (2007) sont les meilleures jamais décrites dans la littérature sur une source de glucose que ce soit en mode Fed-Batch ou en continu. La productivité finale en biomasse r_{MS} du procédé Fed-batch avec un milieu d'alimentation concentré à 500 g/L de glucose est de 0,73 g/L/h avec une $r_{C\text{-}PC}$ de 19,7 mg/L/h. Ces performances sur glucose sont presque deux fois supérieures à nos meilleures productivités en Fed-Batch sur un milieu PDL. En revanche notre procédé de production en chémostat sur PDL permet d'atteindre les mêmes productivités en C-PC grâce à une concentration intracellulaire en C-PC de 35 mg/g_{MS} sur PDL deux fois supérieure celle de Graverholt en continu (15,6 mg/g_{MS}).
Le mode de production en continu reste le plus performant, la durée et la stabilisation des culture en chémostat sur PDL (1200h) nous ont permis de valider la robustesse de notre procédé de production.

3. Stratégie de pilotage par une limitation de la source carbonée et impact sur la C-PC

Le procédé de production en bioréacteur utilise une stratégie d'alimentation par des ajouts exponentiels du milieu d'alimentation concentré en suivant la croissance théorique de la souche. Les substrats carbonés organiques peuvent avoir un effet inhibiteur sur la voie métabolique de la C-PC chez l'espèce *G. sulphuraria* notamment le glucose (Rhie and Beale, 1994; Stadnichuk et al., 1998) et les procédés de culture en substrat organique limité soit en Fed-Batch ou soit en Chémostat sont une alternative à ce problème (Sloth et al., 2006). C'est ainsi que nous avons créé un profil d'alimentation permettant de limiter l'apport de source carbonée organique afin de réduire son effet inhibiteur sur la production de C-PC, ainsi la concentration en lactose est proche de 0 g/L au cours de la culture. La souche *G. sulphuraria* ne doit pas être carencée en azote au cours du procédé de production pour ne pas provoquer la dégradation des phycobiliprotéines, ces protéines peuvent être dégradées pour répondre au besoin azoté du métabolisme cellulaire (Sloth et al., 2006). En imposant une réduction du taux de croissance par le substrat carboné une nette augmentation de la production intracellulaire en C-PC est remarquée que ce soit dans le cadre d'un procédé de production en mode Fed-Batch ou chémostat.
Une phase de maturation à l'issu de notre procédé Fed-Batch de haute densité cellulaire a permis d'augmenter le teneur intracellulaire en protéines de 15% et la C-PC de 60% (Fig. 41). Le pourcentage de sucre totaux est considérablement réduit lors de cette phase de carence en nutriment et est corrélée avec une baisse de la masse sèche par litre de moût. L'apport de substrat carboné favorise le stockage de sucre totaux (Sakurai et al., 2016) principalement sous forme de glycogène chez *G. sulphuraria* (Martinez-Garcia et al., 2016). En apportant que la quantité de substrat carboné nécessaire à la croissance de la souche, le stockage sous forme de glycogène est limité et celui-ci est hydrolysé en glucose lors de période de carence (Fig. 42). Ce type de pilotage de procédé de production permet d'optimiser à la fois la productivité en biomasse et celle des protéines dont la C-PC en même temps. Les cinétiques d'absorption du lactose indiquent que l'affinité du système de transport de ce substrat est située aux alentours de 15 mM (4 g/L) pour le système ayant la plus haute affinité ainsi la logique voudrait que la concentration en lactose résiduel idéale au cours du procédé se situe autour de cette valeur pour une absorption et donc une croissance optimale. Dans la plupart de nos expériences en fermenteurs la concentration en lactose résiduelle est en dessous de la limite de détection par HPLC donc estimé proche 0 g/L au cours du procédé de production ce qui peut laisser penser que l'absorption du lactose à l'échelle cellulaire n'est pas optimale.
Si l'on compare la culture en continu sur glycérol et celle sur PDL réalisées avec la souche UTEX2919 pour les expériences d'expression des gènes, les mêmes débits d'alimentation ont

été appliqués tout en étant à un résiduel nul de substrat dans le milieu. Or les affinités pour ces substrats sont complètement différentes (Fig. 47D, 49D). Une explication serait de dire que la caractérisation biochimique du transporteur n'a pas été optimale car le système de transport du lactose n'a pas été saturé ainsi la mesure des paramètres cinétiques pourrait comporter quelques biais. De plus l'absorption du lactose est caractérisée dans des tubes agités ce qui ne correspond pas exactement aux conditions réelles en bioréacteur. Nous pourrions émettre l'hypothèse également que ces modèles théoriques utilisés pour déterminer les affinités et les vitesses d'absorption ne sont qu'indicatifs, ou bien que le facteur limitant pour la croissance ne soit pas l'absorption du substrat lui-même mais sa métabolisation.

4. Comparaison avec la production de phycocyanine par la Spiruline

D'après la méthode de calcul courante des spiruliniers, la productivité surfacique moyenne annuelle est de 8 $g_{MS}/m^2/j$ sachant que l'épaisseur des bassins est généralement de 20 à 30 cm (Pruvost et al., 2017), la productivité en biomasse est donc comprise entre 0,26-0,4 g_{MS}/L/j. Cette productivité correspondent aux valeurs les plus élevées publiées par Pushparaj et al., (1997) : 0,05-0,32 g/L/j. En bioréacteur la productivité en biomasse maximale retrouvée dans la littérature correspond à 0,82 g/L/j (Chen and Zhang 1997) ce qui reste 34 fois inférieur à la r_{MS} obtenue avec la souche FCC3432 dans le procédé PDL en chémostat. La teneur intracellulaire en C-PC de la Spiruline peut être élevée, en prenant la productivité en biomasse de 0,26-0,4 g_{MS}/L/j et 107 mg/g_{MS} de C-PC, la productivité en C-PC de la Spiruline est de 27,8 à 42,8 mg/L/j ce qui est 16 à 25 fois inférieur aux productivités en C-PC obtenues avec *G. sulphuraria* lors de notre procédé de production sur PDL. En admettant que la teneur protéique de la Spiruline est de 70% MS (Sguera, 2008; FAO, 2008) la productivité en protéines pour les cultures en bassin est comprise entre 0,8-1,25 mg/L/h ce qui entre 4 à 500 fois inférieur à celle de la *G. sulphuraria* sur un procédé PDL.

D. Faisabilité Technicoéconomique

Lors de la mise en place d'un nouveau procédé de production et du transfert à l'étape industriel, une extrapolation du procédé est réalisée en étudiant la faisabilité, les besoins techniques et économiques du projet de réalisation industrielle.
Une extrapolation du procédé de production de la souche FCC3432 en chémostat sur perméat de lait dans un bioréacteur de $100m^3$ est présentée ci-dessous :

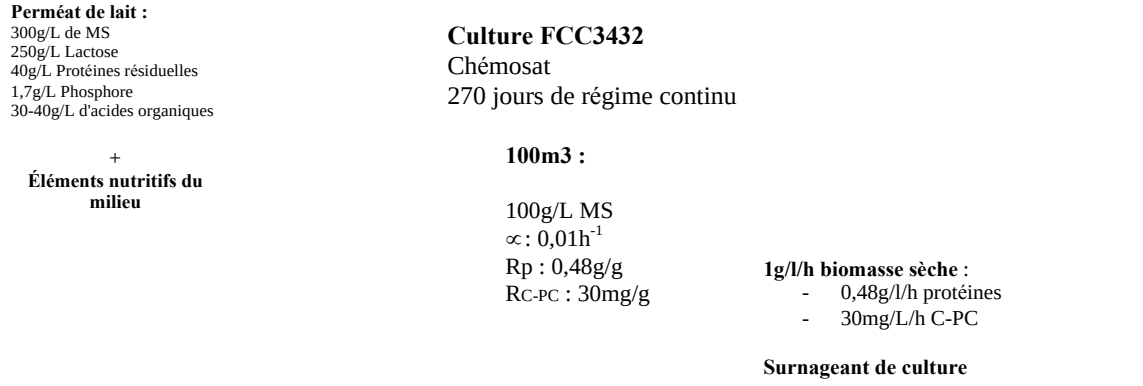


Figure 65. Schéma du procédé de culture en chémosta de la souche FCC 3432 sur un milieu contenant du perméat de lait concentré à 300g/L.

V. Discussion

En prenant en compte les phases de montées en échelle des pré-cultures, la phase Fed-Batch permettant de monter en biomasse jusqu'à 100 g/L de MS, la maintenance et les cycles de nettoyages entre les différentes cultures, nous avons pris comme hypothèse une exploitation industrielle d'une durée globale de 306 jours par an. La phase de production correspondant à 270 jours de production.

Le bilan annuel du procédé de production de la souche FCC3432 sur un bioréacteur de 100m^3 serait de 648 T de biomasse sèche de *G. sulphuraria* FCC3432, soit un équivalent de 311 T de protéines, et 19 T de C-PC.

Pour produire cette biomasse, 6336 T de PDL à 300 g/L serait nécessaire, soit 1408 T de lactose, 9 T de phosphore, et 50 à 100T d'acides organiques consommés.

La DCO du PDL concentré à 300 g/L serait diminuée de 92% grâce à la consommation de 100% du lactose, 97% du phosphore et 50% des acides organiques contenus dans ce coproduit laitiers, et donc plus facile à retraiter par la suite.

La production annuelle de lactosérum étant de 180 MT dont 50% non valorisé (Baldasso et al., 2011), il y a donc 90 MT contenant 4,4 à 4,8% de lactose à utiliser ce qui correspond à 3,9 à 4,3MT de lactose. Pour valoriser la production mondiale annuelle par le biais de notre procédé de production sur PDL il faudrait 3054 bioréacteurs de 100 m^3.

E. Produit innovant à fort potentiel nutritionnel

1. Protéines :

Afin d'évaluer la qualité de notre biomasse de *G. sulphuraria* produite selon un procédé de production en PDL, ses caractéristiques nutritives sont comparées aux sources de protéines existantes sur le marché et aux sources de protéines alternatives telles que la Spiruline ou les insectes (Tab. 36).

Tableau 36. Comparatif des sources de protéines (adapté de The world Economic Forum, 2019 ; lescalories.com)

Nutriment (g)	Bœuf	Porc	Poulet	Blé	Fruit à coque	Haricot	Pois	Tofu	Myco-proteine	Insecte	Spiruline	Galdieria
Calories (Kcal)	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Grams	83	67	140	60	33	157	247	241	235	43	69	51,1
Proteines	20,89	17,3	24,39	5,79	6,53	13,65	13,38	24,05	25,88	27,49	39,63	32,14
Carbohydrates	0,52	-	0,06	44,9	7,39	35,91	35,68	2,84	7,06	2,89	16,48	7,8
Sucre	-	-	-	0,61	1,65	0,5	14	1,71	1,18	-	2,14	
Fibre	-	-	-	7,89	2,11	11,65	14,07	2,41	14,12	2,89	2,48	4,55
Acides gras	12,11	14	11,33	1,17	17,63	0,79	0,99	12,67	6,82	8,68	5,32	3,2
Acides gras Sat	4,76	5,2	3,22	0,26	2,64	0,11	0,18	2,21	1,41	2,89	1,83	0,12
Acides gras Mon.	5,33	6,23	5,05	0,17	11,38	0,06	0,09	3,18	1,18	1,47	0,47	0,101
Acides gras Poly-	0,41	1,26	2,11	0,7	3,25	0,43	0,46	6,4	4,24	3,97	1,43	0,086
Acides gras Trans	-	-	0,09	-	0,01	-	-	-	-	-	-	-
Cholesterol (mg)	70	63,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Calcium (mg)	20,83	14,8	8,39	19,9	28,67	44,09	61,73	679,52	100	65,1	82,76	16,58
Fer (mg)	2,23	0,87	1,15	2,23	1,23	4,63	3,63	4,92	1,18	2,54	19,66	19,54
Heme (mg)	0,78	0,44	0,52	-	-	-	-	-	-	-	-	
Magnesium (mg)	18,33	16,2	29,37	70,5	74,79	70,87	81,48	84,34	105,88	52,08	134,48	9,45
Phosphore (mg)	177,5	152	248,95	195	144,32	223,62	266,67	267,47	611,76	-	81,38	352,2
Potassium (mg)	294,17	244	730,7	237	211,86	634,65	302,47	313,25	235,29	438,34	940	303,35
Sodium (mg)	70,83	49,2	83,92	1,81	1,32	3,15	12,35	9,64	11,76	175,05	722,76	201,04
Zinc (mg)	5,16	2,16	2,06	1,78	1,34	1,69	3,06	2,58	21,18	7,59	1,38	2,81
Cuivre (mg)	0,07	0,03	0,09	0,29	0,5	0,38	0,43	0,48	1,18	-	4,21	
Vitamine C (mg)	-	0,47	-	-	0,26	1,89	98,77	-	-	0,43	6,97	
Thiamine (mg)	0,04	0,48	0,15	0,18	0,1	0,25	0,66	0,12	-	-	1,64	0,08
Ribo flavine (mg)	0,15	0,15	0,34	0,11	0,13	0,09	0,33	0,12	0,54	1,44	2,53	1,6
Niacine (mg)	4,74	2,83	7,8	3,22	2,05	0,91	5,16	0,58	0,82	3,25	8,84	2,15
Pantothenate (mg)	0,57	0,35	1,53	0,61	-	0,35	0,26	2,03	0,59	3,62	2,4	0,3
Vitamine B6 (µg)	0,32	0,26	0,72	0,12	0,12	0,19	0,42	0,2	0,29	-	0,25	1,17
Acide folique (µg)	7,5	4,04	1,4	16,9	19,77	204,72	160,49	21,69	-	-	64,83	290
Vitamine B12 (µg)	2,28	0,36	0,78	-	-	-	-	-	-	3,62	-	0
Vitamine A (µg)	5,83	1,35	-	-	-	-	93,83	-	-	-	20	-

V. Discussion

La biomasse de *G. sulphuraria* contient plus de protéines que les viandes, les insectes ou d'autres protéines alternatives comme les mycoprotéines et plus que les protéines végétales mais contient légèrement moins de protéines que la Spiruline.

La comparaison de la qualités nutritionnelles des protéines de la biomasse de *G. sulphuraria* aux protéines existantes sur le marché permet d'observer les avantages de nutritifs de la biomasse de cette microalgue (Tab. 37).
La biomasse de *G. sulphuraria* est la source de protéines identifiée dans le tableau comme ayant les meilleures teneurs en acides aminés essentiels avec comme seule limite une teneur en histidine de 14,5 mg/g de protéines digestibles au lieu de 15 mg/g préconisé par la FAO. Par comparaison les protéines de Spiruline sont pauvres en lysine et histidine. Les protéines de Chlorelle n'ont pas les teneurs en acides aminés essentiels recommandés, ceci est lié à la faible digestibilité de cette souche microalguale qui réduit la biodisponibilité de ses acides aminés. Les sources de protéines principales de notre alimentation (protéines de lait et végétales) ne contiennent pas les quantités suffisantes en acides aminés essentiels malgré leur bonne digestibilité.

Tableau 37. Profil en acides aminés essentiels des sources principales sources de protéines végétales présentent sur le marché.

mg/g proteines digestibles	**FAO 2011 (acides aminés requis chez l'adulte)**	***Galdieria***	**Spiruline**	***Chlorella vulgaris***	**Protéines Lactoserum**	**Caseine**	**Soja**	**Œuf**	**Blé**	**Lentille**	**Pois**
Lysine	45	54	**38**	**26**	75	73	48	73	**20**	53	59
Thréonine	23	46	37	25	54	41	32	44	23	28	31
Méthionine + cystine	22	31	23	**8**	32	23	23	54	29	**17**	**18**
Tryptophane	6	20	14	17	14	9	10	15	8	6	7
Isoleucine	30	39	45	**16**	51	55	37	52	**27**	33	34
Valine	39	47	51	**26**	48	64	**37**	68	**33**	**37**	**38**
Leucine	59	63	70	**39**	78	82	59	88	**52**	62	**57**
Phenylalanine + tyrosine	38	88	68	43	39	100	67	95	61	64	63
Histidine	15	**14**	**13**	**9**	19	27	18	25	17	21	20,3

En gras est identifié les acides aminés ne répondant pas aux préconisations de la FAO. Tableau créé à partir de Inra CIRAD AFZ 2018 Ajinomoto animal nutrition europe and EAAP are supporting this project (Feedtables.com), (Schaafsma 2000; Shane M. Rutherfurd, Bains, et Moughan 2012; S. M. Rutherfurd et al. 2015; Smith 2008; Plank, 2016, Bleakley et Hayes 2017; Gutiérrez-Salmeán 2015; ANSES 2017).
) *aeb.org ; lanutrition.fr;nutritionvalue.org.*

La Chlorelle et la Spiruline sont reconnues comme étant les microalgues détenant les taux protéiques les plus important et de nombreux produits présents sur le marché sont issus de la formulation de ces espèces sous forme de capsule et comprimés à vocation de compléments alimentaires ou bien sont intégrées dans des produits alimentaires pour leurs propriétés fonctionnelles et nutritionnelles (pates, pain, biscuits, yaourt) (Caporgno and Mathys, 2018). La forte teneur protéique et la richesse en acides aminés de *G. sulphuraria* en fait une biomasse qui pourrait intégrer le marché des nutraceutiques et de la protéine en étant introduit dans d'autres matrices alimentaires.

2. Apport en micronutriments :

Les microalgues telles que la Spiruline et la *G. sulphuraria* sont les denrées alimentaires détenant des teneurs importantes en protéiques, mais elles sont également source de minéraux notamment de fer, ou de vitamines. Toutefois la biodisponibilité et l'assimilation métabolique de ces éléments restent à être confirmées par des études cliniques. Ces nutriments peuvent être absorbés mais pas utilisés par l'organisme comme l'exemple concret de la vitamine B12 contenu dans la Spiruline qui ne serait pas utilisée par l'organisme (Gutiérrez-Salmeán, 2015)

Le fer est présent en grande quantité dans la biomasse de *G. sulphuraria*, avec une teneur de 35,6 mg de fer pour 100g de biomasse sèche, cette souche microalguale pourrait faire partie des aliments riches en fer avec les viandes, poissons, céréales, pois, œufs, légumes
D'après la FAO/WHO, 2004, l'apport journalier de référence (PRI) du fer dépend de la biodisponibilité du fer présent dans les aliments mais la valeur préconisée est de 11 mg/j pour les hommes et 16 mg/j pour les femmes avec une biodisponibilité de 15%. Ce qui correspondait à consommer 205g de biomasse de *G. sulphuraria* pour les hommes et 300 g pour les femmes en imaginant que la biodisponibilité du fer présent dans cette biomasse est de 15%.

La souche de *G. sulphuraria* peut également prétendre aux allégations « riche en riboflavine » et « riche en acide folique » d'après le règlement (CE) N°1924/2006 du parlement européen et du conseil.
L'EFSA détermine comme apport journalier de référence (PRI) de riboflavine une quantité de 1,6mg pour les adolescents (15-17 ans) et adulte. Les besoins augmentent pour les femmes enceintes avec un PRI de 1,9 mg et 2 mg pour celles qui allaitent. Ainsi la consommation de biomasse de *G. sulphuraria* aux quantités de 50 g pour les adultes et 62 g pour les femmes enceintes permettrait de procurer l'apport journalier en riboflavine (EFSA Journal, 2017). Une carence en riboflavine pourrait entraîner des une ariboflavinose accompagnée d'un mal de gorge, une hyperémie, œdème des muqueuses pharyngée et orale, stomatite angulaire… (Fridovich, 1983 ;FAO/WHO, 2001) mais l'EFSA ne reconnaît aucun de ces symptômes car la carence en riboflavine est régulièrement associée à d'autre carence.

L'apport de référence pour l'acide folique est de 250 µg d'équivalent folate alimentaire (DFE)/jour et un apport journalier de référence (PRI) allant de 120 µg DFE/jour pour les enfants de 1 à 3 ans à 330 µg DFE/jour pour les adolescents et adultes, enfin pour les femmes enceintes un apport adéquat est de 500 µg DFE/jour. La dose minimale avec effet nocif observé a été fixée à 5 mg/jour (Scientific Commitee for Food 2000). L'acide folique est important pour la prévention de l'anémie macrocytaire et pour le développement normal du fœtus (FAO/WHO, 2001). Elle contribue aux fonctions psychologiques normales, au maintien d'une vision normale, à la réduction de la fatigue, à la division cellulaire, à la synthèse normale d'acides aminés (EFSA, 2010) Ainsi la biomasse de *G. sulphuraria* pourrait complétement répondre au besoin journalier en consommant 22 g à 90 g de biomasse de *G. sulphuraria* en fonction du type de population.

Les β-carotène ont des effets bénéfiques sur la santé en protégeant la peau contre les lésions induites par les UVs, en protégeant l'ADN, les protéines et lipides des dommages oxydatifs et en contribuant au fonctionnement normal du système immunitaire (EFSA, 2011). Mais une supplémentation en β-carotène sur du long terme pourrait être associé à une augmentation du risque de cancer du poumon (Satia et al., 2009).
Une préconisation de l'ANSES recommande de ne pas consommer plus de 4 à 5 g de Spiruline par jour à cause des fortes teneurs en β-carotène présente chez cette espèce, entre 1,4 et 1,7 mg/g (ANSES, 2017b). Ainsi, la biomasse de *G. sulphuraria* n'en contenant que 19,1 mg pour

100 g il est possible d'en consommer environ 36 g sans dépasser les préconisations journalières qui sont de 7 mg β-carotène par jour.

3. Les antioxydants

En plus de ces caractéristiques nutritionnelles la biomasse de *G. sulphuraria* détient une activité antioxydant prouvée *in vivo* avec une activité antioxydant de 439µmol Trolox/g d'extrait sec (Cao et al., 1993; Zulueta et al., 2009).

Les aliments ayant un fort potentiel antioxydant global sont rares, les molécules à effet antioxydant comme les vitamines E, A, C, les β-carotènes, anthocyanine ou polyphénol en sont généralement extraits et proposé sur le marché en tant que compléments alimentaires. La biomasse de *G. sulphuraria* a un contenu en antioxydant supérieur à de nombreux aliments connus comme étant riche en antioxydant (Tab. 38, https://nutritionfoundation.org.nz/nutrition-facts/nutrition-a-z/Antioxidants). Les condiments comme certaines épices et herbes médicinales gardent une mesure TEAC (Capacité Antioxydant Equivalent Trolox) supérieure à celle de la biomasse séchée de *G. sulphuraria* (Carlsen et al., 2010).

La biomasse de *G. sulphuraria* contient un quantité importante de coenzyme Q10 comparé aux aliments en contenant naturellement comme le bœuf (3-4 mg/g), le poisson (0,1-13g/g), brocoli (0,6-0,8mg/g) et l'œuf (0,07-0,3 mg/g) (Pravst et al., 2010). Des suppléments en coenzyme Q10 sont présent sur le marché pour répondre aux carences, ils sont généralement issus de procédé fermentaire de levure. La coenzyme Q10 (plasquinone ou ubiquinone) est une molécule lipophile localisée dans la membrane des mitochondries, elle agit au niveau de la chaîne respiratoire et à des propriétés anti-oxydantes se traduisant par l'inhibition de l'oxydation des protéines, de l'ADN et de lipides. Mais l'effet santé de cette coenzyme n'est pas reconnu officiellement par manque d'éléments justifiant cet effet (ANSES, 2014).

Tableau 38. Mesure du potentiel antioxydant des aliments

µmole Trolox / g d'extrait sec							
Biomasse *Galdieria sulphuraria*	**Spiruline**	**Produits laitiers**	**Soja**	**Œuf**	**Blé**	**Lentille**	**Pois**
439	59,7[a] (GNC capsules) 72,44[b] 240[c]	1,4[a]	9,9[a]	0,4[a]	16,4[a]	6,6[a]	1[a]

Vin rouge	**Cranberry**	**Artichaut**	**Noix de pecan**	**Persil séché**	**Chocolat (70% cacao)**	**Gingembre séché**	**Thé vert séché**	**Origan séché**	**Cannelle**
25[a]	32,9[a]	47,6[a]	85[a]	100[a]	149,8[a]	203[a]	243,1[a]	632[a]	770[a]

([a]Carlsen et al. 2010; [b]Wu et al. 2005, [c]energybits.com)

4. L'aspect réglementaire

La biomasse de *G. sulphuraria* à la sortie du procédé de production est conforme aux réglementations en vigueur concernant la microbiologie et le dosage de métaux lourd (Partie IV-D-3) car le procédé est réalisé en environnement clos en bioréacteur et une vérification quotidienne d'absence de contaminant est effectuée.

La souche *Galdieria sulphuraria* ne fait pas partie des algues ou microalgues autorisées dans l'alimentation, c'est une espèce qui n'a jamais été consommée et en vertu du règlement de l'UE, « tout aliment n'ayant pas été consommé de manière significative en Europe avant mai 1997 est considéré comme un nouvel aliment ». Le règlement (UE) 2015/2283 détaille la procédé pour la mise sur le marché dans l'UE d'un nouvel aliment (Parlement européen et du conseil, 2015)

Pour cela la biomasse de cette nouvelle souche microlaguale doit obtenir l'autorisation GRAS aux États-Unis et Novel Food en Europe, ces démarches réglementaires ont déjà été engagées par l'entreprise Fermentalg.

5. Culture verticale et emprunte environnementale

Ce procédé de production a un aspect écoresponsable en n'utilisant pas de surfaces cultivables, en recyclant des coproduits industriels difficilement valorisables et en étant peu consommateur d'eau par comparaison à la production d'autres sources protéiques.

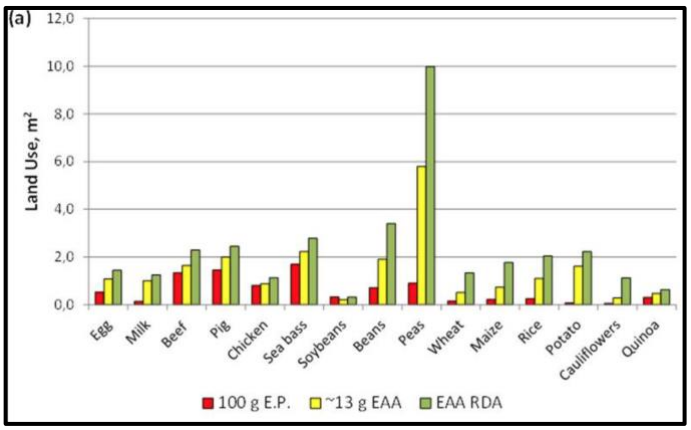


Figure 66. Surface terrestre utilisé pour produire 100 mg (100 ml pour le lait) de produit. EP : EAA : quantité pour fournir 13 acides aminés essentiels RDA : apport journalier recommandé de l'acide aminés limitant (Tessari et al., 2016)

Le pois qui est une source de protéines en forte expansion nécessite une importante surface terrestre cultivable pour répondre aux besoins en acides aminés essentiels journaliers (https://fr.roquette.com/the-pea-in-motion-nutralys/nutralys-elargir-offre-en-proteine-de-pois). La consommation d'eau dans les procédés de production est un élément impactant grandement le cycle de vie d'un produit. Lors de la culture de spiruline en bassin 119 m^3 d'eau est évaporée, pour produire 1T de poudre (Tessari et al., 2016), le procédé de production de *G. sulphuraria* a une évaporation 40 fois inférieure avec une extrapolation de l'évaporation aboutissant à 3m^3 pour 1T de biomasse. La quantité d'eau utilisée au cours du procédé de production sur PDL est estimée à 50-100 L pour 1kg de protéines (2kg de poudre de *G. sulphuraria*).

Tableau 39. Emprunte hydrique de plusieurs source de protéines *(adapté de (Mekonnen and Hoekstra, 2010; Tessari et al., 2016)*

Source	L d'eau consommé/g de protéine
Bœuf	112
Fruits	180
Noisettes	139
Mouton	63
Porc	57
Poulet	34
Lait	31
Racine féculente	31
Œufs	29
Légumes	26
Céréales	21
Spiruline	0,3
Galdieria sulphuraria	0,05-0,1

VI. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

VI. Conclusions et perspectives

Le développement du procédé de production d'une microalgue sur les coproduits de l'industrie laitière exposé dans ce travail présente la démarche et la réflexion des travaux menés au laboratoire et en unité pilote au cours de ce projet. Le comportement de l'espèce *G. sulphuraria* a été étudié selon différents modes et paramètres de culture, à différentes échelles et sous différents angles (cellulaire, moût de fermentation, biomasse séchée). Cette espèce microalguale est fascinante de par sa plasticité et son fort potentiel nutritionnel, c'est pour cela qu'elle est citée dans de nombreuses publications et revues dans le domaine de la nutrition depuis une dizaine d'année.

Les objectifs attribués à ce travail étaient de produire une biomasse microalguale riche en protéines et C-PC en utilisant des coproduits laitiers difficilement valorisables. Afin de remplir ce cahier des charges nous avons utilisé comme indicateurs de performance, la productivité en biomasse, en protéines et en C-PC ainsi que la consommation en PDL.

Le procédé de production a été validé jusqu'à l'échelle pilote en montrant ainsi sa faisabilité à l'échelle industrielle. Les performances maximales obtenues en mode chémostat correspondent à une productivité en biomasse de 1,05 g/L/h, une productivité en protéine de 0,46 g/L/h et une productivité en C-PC de 30 mg/L/h. La consommation de PDL au cours de ce procédé est de 2,9 g/L/h. Des modifications ou des optimisations sont encore nécessaires avant d'envisager une réelle exploitation industrielle, en commençant par une validation du procédé en mode chémostat à l'échelle pilote.

Une des perspectives de ce procédé de production est d'augmenter les productivités en biomasse et en C-PC. L'augmentation des performances de croissance peut être envisagée en réalisant de l'évolution dirigée pour sélectionner une souche avec un taux de croissance plus élevé. La souche de *G. sulphuraria* utilisée dans ce travail pourrait être cultivée en mode chémostat en appliquant un débit d'alimentation de plus en plus fort au cours du temps de manière à sélectionner les cellules pouvant soutenir des taux de croissance plus élevés.

Améliorer la teneur protéique et la composition en acides aminés essentiels des souches peut être envisagé par un pilotage du procédé en bioréacteur favorisant la production de protéines. Nous avons remarqué que les carences en substrat lors des phases de maturation provoquaient une augmentation de la teneur intracellulaire en protéines dont la C-PC. Une autre approche serait d'appliquer des pressions de sélection pouvant influencer le métabolisme des acides aminés et notamment de l'histidine qui est l'acide aminé limitant dans la biomasse de *G. sulphuraria*.

L'augmentation de la productivité en C-PC pourrait se faire de la même manière que pour les protéines par sélection de nouveaux variants ou pilotage de procédé. La recherche de nouveaux variants plus performants est un processus réalisé en continu à Fermentalg.
Nous pourrions ajouter un criblage par pression de sélection ciblant les gènes identifier lors de l'étude de l'expression différentielle comme celui de la thréonine déshydrogénase. Des clones avec un niveau d'expression de ce gène plus élevé pourraient également être obtenus par la technique CRISPR.
Une autre solution serait d'insérer les gènes identifiés comme responsable de la production de C-PC dans un organisme ayant un taux de croissance supérieur. La C-PC serait alors issue d'organismes génétiquement modifiés.

Si ce procédé avait une fonction 100% biorémédiation avec pour but d'utiliser la majorité des éléments pouvant être retrouvés dans les coproduits laitiers (lactose, minéraux et acides

organiques), la stratégie de pilotage de la culture en bioréacteur pourrait être de limiter le taux de croissance des souches afin de leur laisser plus de temps pour consommer l'ensemble des éléments du milieu. La sélection dirigée en mode chémostat permettant d'isoler les cellules les plus consommatrices de lactose peut également être envisagée.

Afin de valider le modèle de transport de substrats présenté, il pourrait être envisager de réaliser des expériences complémentaires. Les gènes codant les transporteurs de lactose putatif et la β-galactosidase pourraient être clonés et exprimés dans un système hétérologue tel que *S. cerevisiae* afin de valider leur capacité à transporter le lactose et d'autres substrats. Nous pourrions imaginer obtenir via le système CRISPR des clones dont le niveau d'expression des transporteurs spécifiques du lactose serait constitutivement élevé ce qui permettrait des co-cultures sur un milieu PDL et glycérol sans temps de latence.

Ce travail a mis en avant le potentiel nutritionnel de l'espèce *G. sulphuraria,* en tant que source de protéines, de fer, de manganèse et de vitamines (riboflavine et acide folique). Cette nouvelle source de protéine doit être maintenant validée par les autorités sanitaires afin de pouvoir être mise sur le marché de l'alimentation humaine. Les propriétés physicochimiques de ce produit pourraient être identifiées afin de connaître le comportement de cette biomasse dans les matrices alimentaires. Cette biomasse a une activité antioxydante *in vitro* de 439 µmol Trolox/g_{MS} mais pour toute revendication de l'aspect antioxydant *in vivo* ou d'effet santé chez l'homme la biomasse de *G. sulphuraria* devra être évaluée par une étude clinique.

VI. Conclusions et perspectives

VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

VII. Références bibliographiques

Abdulqader, Barsanti, Tredici, 2000. Harvest of Arthrospira platensis from lake Kossorom (Chad) and its household usage among the Kanembu. *Journal of Applied Phycology*.

Abreu, A.P., Fernandes, B., Vicente, A.A., Teixeira, J., Dragone, G., 2012. Mixotrophic cultivation of Chlorella vulgaris using industrial dairy waste as organic carbon source. *Bioresource Technology* 118, 61–66.

Adir, N., Vainer, R., Lerner, N., 2002. Refined structure of c-phycocyanin from the cyanobacterium Synechococcus vulcanus at 1.6 Å: insights into the role of solvent molecules in thermal stability and co-factor structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1556, 168–174.

Agromedia, 2015. Ingrédients : la tendance est au naturel. [WWW Document]. URL *http://www.agro-media.fr/analyse/ingredients-la-tendance-est-au-naturel-19789.html* (accessed 3.23.18).

Alexandratos, N., Bruinsma, J., 2012. World agriculture towards 2030/2050 : the 2012 revision. ESA Working paper.

Allen, M. belle, 1959. Studies with Cyanidium caldarium, an anomalously pigmented chlorophyte. *Archiv für Mikrobiologie* 270–277.

ANSES, 2017a. L'ANSES actualise les repères de consommations alimentaires pour la population française.

ANSES, 2017b. Avis de l'Agence Nationale de sécurité de l'alimentation de l'environnement et du travail relatif aux "risques liés à la consommation de compléments alimentaires contenant de la spiruline". (No. Saisine n° 2014-SA-0096).

ANSES, 2014. Avis de l'ANSES relatif aux risuqes liés à la présence de "levure de riz rouge" dans les compléme,ts alimentaire. (No. Saisine N°2012-SA-0228).

Anupama, Ravindra, P., 2000. Value-added food: single cell protein. *Biotechnology Advances* 18, 459–479.

Arevalo, 2017. Etude environnementale comparative des procédés de valorisation du lactosérum.

Audic, J.-L., Chaufer, B., Daufin, G., 2003. Non-food applications of milk components and dairy co-products: A review. *Le Lait* 83, 417–438.

Avila-Leon, I., Chuei Matsudo, M., Sato, S., de Carvalho, J.C.M., 2012. Arthrospira platensis biomass with high protein content cultivated in continuous process using urea as nitrogen source: High protein biomass by continuous process with urea. *Journal of Applied Microbiology* 112, 1086–1094.

Baldasso, C., Barros, T.C., Tessaro, I.C., 2011. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. *Desalination* 278, 381–386.

Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Prjibelski, A.D., Pyshkin, A.V., Sirotkin, A.V., Vyahhi, N.,

VII. Références bibliographiques

Tesler, G., Alekseyev, M.A., Pevzner, P.A., 2012. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology* 19, 455–477.

Barbier, G., 2005. Comparative Genomics of Two Closely Related Unicellular Thermo-Acidophilic Red Algae, Galdieria sulphuraria and Cyanidioschyzon merolae, Reveals the Molecular Basis of the Metabolic Flexibility of Galdieria sulphuraria and Significant Differences in Carbohydrate Metabolism of Both Algae. *PLANT PHYSIOLOGY* 137, 460–474.

Bardy, S., 2016. Valorisation du lactosérum.

Batista, A.P., Nunes, M.C., Fradinho, P., Gouveia, L., Sousa, I., Raymundo, A., Franco, J.M., 2012. Novel foods with microalgal ingredients – Effect of gel setting conditions on the linear viscoelasticity of Spirulina and Haematococcus gels. *Journal of Food Engineering* 110, 182–189.

Beale, S.I., 1984. Enzymatic Heme Oxygenase Activity in Soluble Extracts of the Unicellular Red Alga, Cyanidium caldarium. *Archives of biochemistry and biophysics* 235, 371–384.

Beale, S.I., cornejo, J., 1991a. Biosynthesis of Phycobilins. 3(Z)-phycoerythrobilin and 3(z)-phycocyanobilin are intermediates in the formation of 3(E)-phycocyanobilin from biliverdin IXa. *The journal of biological chemistry* 266, 22333–22333.

Beale, S.I., cornejo, J., 1991b. Biosynthesis of Phycobilins. Ferredoxin-mediated reduction of biliverdin catalyzed by extracts of cyanidium caldarium. *The journal of biological chemistry* 266, 22328–22332.

Bekatorou, et al, 2006. Production of food grade yeasts. *Food Technol Biotechnol*.

Belay, A., Ota, Y., Miyakawa, K., Shimamatsu, H., 1993. Current knowledge on potential health benefits of Spirulina. *Journal of Applied Phycology* 5, 235–241.

Benedetti, S., Benvenuti, F., Scoglio, S., Canestrari, F., 2010. Oxygen radical absorbance capacity of phycocyanin and phycocyanobilin from the food supplement Aphanizomenon flos-aquae. *J Med Food* 13, 223–227.

Bennetau-Pelissero, C., 2019. Natural Estrogenic Substances, Origins, and Effects, in: Mérillon, J.-M., Ramawat, K.G. (Eds.), *Bioactive Molecules in Food. Springer International Publishing*, Cham, pp. 1157–1224.

Bentahar, 2018. Utilisation et valorisation du perméat de lactosérum acide par la microalgue Scenedesmus obliquus pour la production d'enzyme de type β-galactosidase.

Bergeron Girard, J.-M., 2014. Utilisation du lactosérum dans un procédé de culture de microalgues mixotrophes pour la production de biodiesel (Génie biotechnologique). Sherbrroke, Canada.

Birand, P., 2009. Avis de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments relatif à la teneur maximale en arsenic inorganique recommandée pour les algues laminaires et aux modalités de consommation de ces algues compte tenu de leur teneur élevée en iode (No. 2007-SA- 0007).

VII. Références bibliographiques

Bleakley, S., Hayes, M., 2017. Algal Proteins: Extraction, Application, and Challenges Concerning Production. *Foods* 6, 33.

Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120.

Bollon, 2012. Etude des mécanismes physiques et de leur influence sur la cinétique de méthanisation en voie sèche : essais expérimentaux et modélisation.

Borges, W. da S., Araújo, B.S.A., Moura, L.G., Coutinho Filho, U., de Resende, M.M., Cardoso, V.L., 2016. Bio-oil production and removal of organic load by microalga Scenedesmus sp. using culture medium contaminated with different sugars, cheese whey and whey permeate. *Journal of Environmental Management* 173, 134–140.

Borowitzka, M.A., 2013. High-value products from microalgae—their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology* 25, 743–756.

Borowitzka, M.A., 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology* 70, 313–321.

Boussiba, Richmond, 1979. Isolation and Characterization of Phycocyanins from the Blue-Green Alga Spirulinaplatensis. *Arichives of microbiology*.

Brown et al, 1982. The effect of N-methylprotoporphyrin IX on the synthesis of photosynthetic pigments in Cyanidium caldarium. *Biochemical journal* 208, 487–491.

Bumbak, F., Cook, S., Zachleder, V., Hauser, S., Kovar, K., 2011. Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: achievements, potential and possible limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 91, 31–46.

Bylund, 1995. Dairy processing handbook, Tetra Pak Processing Systems AB. ed.
Cagnac, Gehin, Champeaud, 2017a. Method for culturing unicellular red alage (URA) with milk permeate. WO2017093345A1.

Cagnac, O., 2017. Acid composition comprising a phycocyanin. WO2017/050918A1.

Cagnac, O., Richard, L., Labro, J., 2017. Novel Method for the Culture of Unicellular Red Algae. WO/2017/050917.

Cagnac, Richard, Labro, 2017b. Nouveau procédé de culture d'algues rouges unicellulaires. WO2017/050917A1.

Cao, G., Alessio, H.M., Cutler, R.G., 1993. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* 14, 303–311.

Caporgno, M.P., Mathys, A., 2018. Trends in Microalgae Incorporation Into Innovative Food Products With Potential Health Benefits. *Frontiers in Nutrition* 5, 58.

Carfagna, S., Landi, V., Coraggio, F., Salbitani, G., Vona, V., Pinto, G., Pollio, A., Ciniglia, C., 2018. Different characteristics of C-phycocyanin (C-PC) in two strains of the extremophilic

Galdieria phlegrea. *Algal Research* 31, 406–412.

Carfagna, S., Napolitano, G., Barone, D., Pinto, G., Pollio, A., Venditti, P., 2015. Dietary Supplementation with the Microalga *Galdieria sulphuraria* (Rhodophyta) Reduces Prolonged Exercise-Induced Oxidative Stress in Rat Tissues. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2015*, 1–11.

Carlsen, M.H., Halvorsen, B.L., Holte, K., Bøhn, S.K., Dragland, S., Sampson, L., Willey, C., Senoo, H., Umezono, Y., Sanada, C., Barikmo, I., Berhe, N., Willett, W.C., Phillips, K.M., Jacobs, D.R., Blomhoff, R., 2010. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutrition Journal* 9, 3.

CEVA, 2014. Réglementation algues alimentaires Synthèse CEVA au 10/02/2014.

Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., Bunnag, B., 2012. Stability of phycocyanin extracted from Spirulina sp.: Influence of temperature, pH and preservatives. *Process Biochemistry* 47, 659–664.

Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., Loha, V., Tia, S., Bunnag, B., 2011. Separation and purification of phycocyanin from Spirulina sp. using a membrane process. *Bioresource Technology* 102, 7159–7164.

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

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

Chen, H.-B., Wu, J.-Y., Wang, C.-F., Fu, C.-C., Shieh, C.-J., Chen, C.-I., Wang, C.-Y., Liu, Y.-C., 2010. Modeling on chlorophyll a and phycocyanin production by Spirulina platensis under various light-emitting diodes. *Biochemical Engineering Journal* 53, 52–56.

Chen, L.Y., 2010. Free-energy landscape of glycerol permeation through aquaglyceroporin GlpF determined from steered molecular dynamics simulations. *Biophysical Chemistry* 151, 178–180.

Chisti, Y., 2016. Large-Scale Production of Algal Biomass: Raceway Ponds, in: Bux, F., Chisti, Y. (Eds.), Algae Biotechnology. *Springer International Publishing, Cham*, pp. 21–40.

Ciniglia, C., Yang, E.C., Pollio, A., Pinto, G., Iovinella, M., Vitale, L., Yoon, H.S., 2014. Cyanidiophyceae in Iceland: plastid *rbc* L gene elucidates origin and dispersal of extremophilic *Galdieria sulphuraria* and *G. maxima* (Galdieriaceae, Rhodophyta). *Phycologia* 53, 542–551.

Ciniglia, C., Yoon, H.S., Pollio, A., Pinto, G., Bhattacharya, D., 2004. Hidden biodiversity of the extremophilic Cyanidiales red algae: CYANIDIALES BIODIVERSITY. *Molecular Ecology* 13, 1827–1838.

Cloeter, Schönknecht, 2016. Temperature Dependent Changes in Glycolysis in the Thermoacidophilic Red Alga Galdieria sulphuraria. *Howard Hughes Medical Institute*.

Cock, P.J.A., Grüning, B.A., Paszkiewicz, K., Pritchard, L., 2013. Galaxy tools and workflows

for sequence analysis with applications in molecular plant pathology. *PeerJ 1*, e167.
Coelho Sampaio, F., da Conceição Saraiva, T.L., Dumont de Lima e Silva, G., Teles de Faria, J., Grijó Pitangui, C., Aliakbarian, B., Perego, P., Converti, A., 2016. Batch growth of Kluyveromyces lactis cells from deproteinized whey: Response surface methodology versus Artificial neural network—Genetic algorithm approach. *Biochemical Engineering Journal* 109, 305–311.

Collier, Grossman, 1992. Chlorosis Induced by Nutrient Deprivation in Synechococcus sp. StrainPCC7942: Not All Bleaching Is the Same. *Journal of biotechnology*.

Collins, A.M., Liberton, M., Jones, H.D.T., Garcia, O.F., Pakrasi, H.B., Timlin, J.A., 2012. Photosynthetic Pigment Localization and Thylakoid Membrane Morphology Are Altered in Synechocystis 6803 Phycobilisome Mutants. *Plant physiology* 158, 1600–1609.

Commission européenne, 2008. REGLEMENT (CE) N° 629/2008 DE LA COMMISSION du 2 juillet 2008 modifiant le réglement (CE) n° 1881/2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaire.

Conde, C., Silva, P., Agasse, A., Tavares, R.M., Delrot, S., Gerós, H., 2007. An Hg-sensitive channel mediates the diffusional component of glucose transport in olive cells. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - *Biomembranes* 1768, 2801–2811.

Conesa, A., Madrigal, P., Tarazona, S., Gomez-Cabrero, D., Cervera, A., McPherson, A., Szcześniak, M.W., Gaffney, D.J., Elo, L.L., Zhang, X., Mortazavi, A., 2016. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biology* 17.

Consoglobe, 2017. Journée nationale de la Spiruline, aliment aux 1000 vertus. [WWW Document]. URL https://www.consoglobe.com/spiruline-journee-nationale-cg/2 (accessed 3.23.18).

Cozzolino et al., 2000. Molecular variation in Galdieria sulphuraria (Galdieri) Merola and its bearing on taxonomy. *Hydrobiologia* 433, 145–151.

Cruchot, H., 2008. La spiruline bilan et perspectives (Pharmacie). Université de Franche-Comte.

Cruz de Jesús, V., Gutiérrez-Rebolledo, G.A., Hernández-Ortega, M., Valadez-Carmona, L., Mojica-Villegas, A., Gutiérrez-Salmeán, G., Chamorro-Cevallos, G., 2016. Methods for Extraction, Isolation and Purification of C-phycocyanin. *International Journal of Food and Nutritional Science.*

Cuellar-Bermudez, S.P., Aguilar-Hernandez, I., Cardenas-Chavez, D.L., Ornelas-Soto, N., Romero-Ogawa, M.A., Parra-Saldivar, R., 2015. Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins: High-value metabolites form algae. *Microbial Biotechnology* 8, 190–209.

Das, M., Raychaudhuri, A., Ghosh, S.K., 2016. Supply Chain of Bioethanol Production from Whey: A Review. *Procedia Environmental Sciences* 35, 833–846.

Dasgupta, C.N., 2015. Algae as a Source of Phycocyanin and Other Industrially Important Pigments, in: Das, D. (Ed.), Algal Biorefinery: An Integrated Approach. *Springer International*

Publishing, Cham, pp. 253–276.

Davila-Vazquez, G., Alatriste-Mondragón, F., de León-Rodríguez, A., Razo-Flores, E., 2008. Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: Influence of initial substrate concentration and pH. *International Journal of Hydrogen Energy* 33, 4989–4997.

Davis, A.M., Iovinella, M., James, S., Robshaw, T., Dodson, J.H., Herrero-Davila, L., Clark, J.H., Agapiou, M., McQueen-Mason, S., Pinto, G., Ciniglia, C., Chong, J.P.J., Ashton, P.D., Davis, S.J., 2016. Using MinION nanopore sequencing to generate a de novo eukaryotic draft genome: preliminary physiological and genomic description of the extremophilic red alga Galdieria sulphuraria strain SAG 107.79. *bioRxiv*.

De Glutz, F.-N., 2009. Fuel bioethanol production from whey permeate. Ecole polytechnique de Lausanne (suisse).

Dellero, Y., Cagnac, O., Rose, S., Seddiki, K., Cussac, M., Morabito, C., Lupette, J., Aiese Cigliano, R., Sanseverino, W., Kuntz, M., Jouhet, J., Maréchal, E., Rébeillé, F., Amato, A., 2018. Proposal of a new thraustochytrid genus Hondaea gen. nov. and comparison of its lipid dynamics with the closely related pseudo-cryptic genus Aurantiochytrium. *Algal Research* 35, 125–141.

Delrue, F., Álvarez-Díaz, P., Fon-Sing, S., Fleury, G., Sassi, J.-F., 2016. The Environmental Biorefinery: Using Microalgae to Remediate Wastewater, a Win-Win Paradigm. *Energies* 9, 132.

Doemel, W.N., Brock, T.D., 1971. The Physiological Ecology of Cyanidium caldarium. *Journal of General Microbiology* 67, 17–32.

DuBois, Michel., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, Fred., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem*. 28, 350–356.

Edwards, M.R., Hauer, C., Stack, R.F., Eisele, L.E., MacColl, R., 1997. Thermophilic C-phycocyanin: effect of temperature, monomer stability, and structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1321, 157–164.

EFSA, 2012. Annual report 2012 (No. 978-92-9199-543–1).

EFSA, 2011. Scientific Opinion onthe substantiation of health claims related to beta-carotene andprotection of DNA, proteins and lipids from oxidative damage (ID 19, 197, 1262, 1460), protection of the skin from UV-induced (including photo-oxidative) damage (ID 178, 197, 1263, 1461, 1968, 2320) and maintenance of the normal function of the immune system (ID 200, 1462)pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/20061EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA).

EFSA, 2010. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to folate and contribution to normal psychological functions (ID 81, 85, 86, 88), maintenance of normal vision (ID 83, 87), reduction of tiredness and fatigue (ID 84), cell division (ID 195, 2881) and contribution to normal amino acid synthesis (ID 195, 2881) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/20061.

VII. Références bibliographiques

EFSA Journal, 2017. Dietary Reference values for riboflavin. EFSA Journal.

El-Samragy, Y.A., Khorshid, M.A., Foda, M.I., Shehata, A.E., 1996. Effect of fermentation conditions on the production of citric acid from cheese whey by Aspergillus niger. International *Journal of Food Microbiology* 29, 411–416.

El-Wahab, H.M.F.A., Moram, G.S.E.-D., 2013. Toxic effects of some synthetic food colorants and/or flavor additives on male rats. *Toxicology and Industrial Health* 29, 224–232.

Eriksen, N.T., 2016. Research Trends in the Dominating Microalgal Pigments, β-carotene, Astaxanthin, and Phycocyanin Used in Feed, in Foods, and in Health Applications. *Journal of Nutrition & Food Sciences* 06.

Eriksen, N.T., 2008. Production of phycocyanin—a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Applied Microbiology and Biotechnology* 80, 1–14.

Espinosa-Gonzalez, I., Parashar, A., Bressler, D.C., 2014. Heterotrophic growth and lipid accumulation of Chlorella protothecoides in whey permeate, a dairy by-product stream, for biofuel production. *Bioresource Technology* 155, 170–176.

Eze, McElhaney, 1981. The effect of alterations in the fluidity and phase state of the membrane lipids on the passive permeation and facilitated diffusion og glycerol in Escherichia coli.

FAO, 2017. Calculationof the energy content of foods-energy conversion factors.

FAO, 2008. A review on culture, production and use of spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish (No. Circular No. 1034).

FAO Expert Consultation, 2013. Dietary protein quality evaluation in human nutrition.
FAO, IFAD, UNICEF, WFP & WHO, 2018. The State of food Security and Nutrition in the World 2018. Building Climate Resilience for Food Security and Nutrition. Rome.

FAO/WHO, 2004. Vitamin and mineral requirements in human nutrition.

FAO/WHO, 2001. Human vitamin and mineral requirements.

FDA, 2013. Listing of color additives exempt from certification; Spirulina Extract.

Fernández-Rojas, B., Hernández-Juárez, J., Pedraza-Chaverri, J., 2014. Nutraceutical properties of phycocyanin. *Journal of Functional Foods* 11, 375–392.

Ferreira, C., van Voorst, F., Martins, A., Neves, L., Oliveira, R., Kielland-Brandt, M.C., Lucas, C., Brandt, A., 2005. A Member of the Sugar Transporter Family, Stl1p Is the Glycerol/H^+ Symporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* 16, 2068–2076.

Filstrup, C.T., Downing, J.A., 2017. Relationship of chlorophyll to phosphorus and nitrogen in nutrient-rich lakes. *Inland Waters* 7, 385–400.

FMI, 2016. Natural Food colours Market : Demand for Clean Label Products Growing : Global Industry Analysis and Opportunity Assessment, 2016-2026.

VII. Références bibliographiques

Fridovich, I., 1983. Superoxide radical: an endogenous toxicant. Annu. Rev. *Pharmacol. Toxicol*. 23, 239–257.

Friedmann, 1964. Progress in the biological exploration of caves and subterranean waters in Israel. *Int. J. Speleol*.

Friends of the Earth Europe, 2018. Soy alert. How to increase the EU's plant protein production in a sustainable and agroecological way?

Fromme, R., 2009. Crystal Structure of C-Phycocyanin from Galdieria sulphuraria. (*:unav*).

Futuremarketinsights, 2019. Organic Pigments Market: Global Industry Analysis and Opportunity Assessment 2016-2026.

García, J.L., de Vicente, M., Galán, B., 2017. Microalgae, old sustainable food and fashion nutraceuticals. *Microbial Biotechnology*.

Gilroy, et al., 2000. Assessing Potential Health Risks from Microcystin Toxins in Blue-Green Algae Dietary Supplements. *Environmental Health Perspectives*.

Glazer, A.N., 1994. Phycobiliproteins - a family of valuable, widely used fluorophores. *Journal of Applied Phycology* 6, 105–112.

Godfray et al., 2010. Food security : the challenge of feeding 9 billion people. *Science* 327.

Grand View Research, Inc, 2018. Dietary supplement market size, share & trend analysis report by ingredient (botanicals, vitamins, minerals, amino acids, enzymes), by product, by application, by end-use, and segment forecast, 2018-2024 (No. ID:978-1-68038-919-7).

Graverholt, O.S., Eriksen, N.T., 2007. Heterotrophic high-cell-density fed-batch and continuous-flow cultures of Galdieria sulphuraria and production of phycocyanin. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77, 69–75.

Graziani, G., Schiavo, S., Nicolai, M.A., Buono, S., Fogliano, V., Pinto, G., Pollio, A., 2013. Microalgae as human food: chemical and nutritional characteristics of the thermo-acidophilic microalga Galdieria sulphuraria. *Food Funct.* 4, 144–152.

Green, A.L., Anderson, E.J., Brooker, R.J., 2000. A Revised Model for the Structure and Function of the Lactose Permease: EVIDENCE THAT A FACE ON TRANSMEMBRANE SEGMENT 2 IS IMPORTANT FOR CONFORMATIONAL CHANGES. *Journal of Biological Chemistry* 275, 23240–23246.

Gross, W., Oesterhelt, C., Tischendorf, G., Lederer, F., 2002. Characterization of a non-thermophilic strain of the red algal genus *Galdieria* isolated from Soos (Czech Republic). *European Journal of Phycology* 37, 477–482.

Gross, W., Schnarrenberger, C., 1995. Heterotrophic Growth of Two Strains of the Acido-Thermophilic Red Alga Galdieria sulphuraria. *Plant and Cell Physiology* 4, 633–638.

Guéguen, J., Walrand, S., Bourgeois, O., 2016. Les protéines végétales : contexte et potentiels en alimentation humaine. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 51, 177–185.

VII. Références bibliographiques

Guimarães, P.M.R., Teixeira, J.A., Domingues, L., 2010. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnology Advances* 28, 375–384.

Gutiérrez-Salmeán, 2015. Nutritional and toxicological aspects of Spirulina (Arthrospira). *Nutrition hospitalaria*.

Hambraeus, 1982. Nutrational aspects of milk proteins. Developments in dairy chemistry.

Hénin, J., Tajkhorshid, E., Schulten, K., Chipot, C., 2008. Diffusion of Glycerol through Escherichia coli Aquaglyceroporin GlpF. *Biophysical Journal* 94, 832–839.

Henkanatte-Gedera, S.M., Selvaratnam, T., Karbakhshravari, M., Myint, M., Nirmalakhandan, N., Van Voorhies, W., Lammers, P.J., 2017. Removal of dissolved organic carbon and nutrients from urban wastewaters by Galdieria sulphuraria : Laboratory to field scale demonstration. *Algal Research* 24, 450–456.

Holman, B.W.B., Malau-Aduli, A.E.O., 2013. *Spirulina* as a livestock supplement and animal feed: *Spirulina* supplementation in livestock. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 97, 615–623.

Houlbrooke, D.J., Horne, D.J., Hedley, M.J., Hanly, J.A., Scotter, D.R., Snow, V.O., 2004. Minimising surface water pollution resulting from farm-dairy effluent application to mole-pipe drained soils. I. An evaluation of the deferred irrigation system for sustainable land treatment in the Manawatu. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 47, 405–415.

Hu, J., Nagarajan, D., Zhang, Q., Chang, J.-S., Lee, D.-J., 2018. Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. *Biotechnology Advances* 36, 54–67.

Jain, K., Krause, K., Grewe, F., Nelson, G.F., Weber, A.P.M., Christensen, A.C., Mower, J.P., 2015. Extreme Features of the Galdieria sulphuraria Organellar Genomes: A Consequence of Polyextremophily? *Genome Biology and Evolution* 7, 367–380.

Jaouen, P., Lepine, B., Rossignol, N., Royer, R., 1999. Clarification and concentration with membrane technology of a phycocyanin solution extracted from Spirulina platensis 5.

Jelen, 2009. Dried whey, whey proteins, lactose and lactose derivative products, in: Dairy Powders and Concentrated Products.

Jespersen, L., Stromdahl, L.D., Olsen, K., Skibsted, L.H., 2005. Heat and light stability of three natural blue colorants for use in confectionery and beverages. *European Food Research and Technology* 220, 261–266.

Jiang, Y., Xie, P., Chen, J., Liang, G., 2008. Detection of the hepatotoxic microcystins in 36 kinds of cyanobacteria *Spirulina* food products in China. *Food Additives & Contaminant*s: Part A 25, 885–894.

Ju, X., Igarashi, K., Miyashita, S., Mitsuhashi, H., Inagaki, K., Fujii, S., Sawada, H., Kuwabara, T., Minoda, A., 2016. Effective and selective recovery of gold and palladium ions from metal wastewater using a sulfothermophilic red alga, Galdieria sulphuraria. *Bioresource Technology*

211, 759–764.

Karradt, A., Sobanski, J., Mattow, J., Lockau, W., Baier, K., 2008. NblA, a Key Protein of Phycobilisome Degradation, Interacts with ClpC, a HSP100 Chaperone Partner of a Cyanobacterial Clp Protease. *Journal of Biological Chemistry* 283, 32394–32403.

Kemp, Quickenden, 1989. WHEY PROCESSING FOR PROFIT - A WORTHY ALTERNATIVE, in: *Resources and Applications of Biotechnology: The New Wave*.

Khanafari, Sepahei, Mogharab, 2006. Production and recovery of poly-b-hydroxybutyrate from whey degradation by azotobacter. *Journal of Environmental Health Science & Engineering.*

Kim, D., Langmead, B., Salzberg, S.L., 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods* 12, 357–360.

Kjeldahl, J., 1883. Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. Zeitschrift f⟆r *Analytische Chemie* 22, 366–382. https://doi.org/10.1007/BF01338151

Kulcsár, L., Fekete, E., Karaffa, L., Kavalecz, N., Orosz, A., Flipphi, M., 2016. Characterization of a second physiologically relevant lactose permease gene (lacpB) in Aspergillus nidulans. *Microbiology* 162, 837–847.

Kulshreshtha, A., J., A., Jarouliya, U., Bhadauriya, P., Prasad, G., Bisen, P., 2008. Spirulina in Health Care Management. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 9, 400–405.

Kumar, A., Christian, P.K., Panchal, K., Guruprasad, B.R., Tiwari, A.K., 2017. Supplementation of Spirulina (*Arthrospira platensis*) Improves Lifespan and Locomotor Activity in Paraquat-Sensitive *DJ-1β* $^{\Delta 93}$ Flies, a Parkinson's Disease Model in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Dietary Supplements* 14, 573–588.

Leclerc, et al., 1983. Le climat annuel de deux grottes et d'une église du Poitou, ou vivent des colonies pures d'algues sciaphiles. Cryptogamie. *Algol.*

Legifrance, 2014. Arrêté du 24 juin 2014 établissant la liste des plantes, autres que les champignons, autorisées dans les compléments alimentaires et les conditions de leur emploi.

Les Echos, 2017. L'essor mondial des protéines végétales.

Li, H., Durbin, R., 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754–1760.

Liu, L.-N., 2016. Distribution and dynamics of electron transport complexes in cyanobacterial thylakoid membranes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - *Bioenergetics* 1857, 256–265.

Liu, Pohnert, G., Wei, D., 2016. Extracellular Metabolites from Industrial Microalgae and Their Biotechnological Potential. *Marine Drugs* 14, 191.

Lucová, M., Hojerová, J., Pažoureková, S., Klimová, Z., 2013. Absorption of triphenylmethane dyes Brilliant Blue and Patent Blue through intact skin, shaven skin and lingual mucosa from daily life products. *Food and Chemical Toxicology* 52, 19–27.

VII. Références bibliographiques

Lukondeh, T., Ashbolt, N.J., Rogers, P.L., 2005. Fed-batch fermentation for production of Kluyveromyces marxianusFII 510700 cultivated on a lactose-based medium. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 32, 284–288.

M. Bishop, W., M. Zubeck, H., 2012. Evaluation of Microalgae for use as Nutraceuticals and Nutritional Supplements. *Journal of Nutrition & Food Sciences* 02.

Malige, et al., 1982. Procdédé de cultures, en particulier de levures, sur du lactosérum avec une association de souches judicieusement choisies et des mutants spécifiques d'une souche. EP0050571A1.

Manali, K.M., Arunraj, R., Kumar, T., Ramya, M., 2017. Detection of microcystin producing cyanobacteria in Spirulina dietary supplements using multiplex HRM quantitative PCR. *Journal of Applied Phycology* 29, 1279–1286.

Manen, J.-F., Falquet, J., 2002. The cpcB-cpcA locus as a tool for the genetic characterization of the genus Arthrospira (Cyanobacteria): evidence for horizontal transfer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 861–867.

Marquez, et al, 1993. Growth Characteristics of Spirulina platensis in mixotrophic and heterotrophic conditions. journal of fermentation and bioengineering.

Martelli, G., Folli, C., Visai, L., Daglia, M., Ferrari, D., 2014. Thermal stability improvement of blue colorant C-Phycocyanin from Spirulina platensis for food industry applications. *Process Biochemistry* 49, 154–159.

Martinez-Garcia, M., Kormpa, A., van der Maarel, M.J.E.C., 2017. The glycogen of Galdieria sulphuraria as alternative to starch for the production of slowly digestible and resistant glucose polymers. *Carbohydrate Polymers* 169, 75–82.

Martinez-Garcia, M., Stuart, M.C.A., van der Maarel, M.J.E.C., 2016. Characterization of the highly branched glycogen from the thermoacidophilic red microalga Galdieria sulphuraria and comparison with other glycogens. *International Journal of Biological Macromolecules* 89, 12–18.

Martinez-Garcia, M., van der Maarel, M.J.E.C., 2016. Floridoside production by the red microalga Galdieria sulphuraria under different conditions of growth and osmotic stress. *AMB Express 6.*

Marwaha, S.S., Kennedy, J.F., 2007. Whey-pollution problem and potential utilization. I*nternational Journal of Food Science & Technology* 23, 323–336.

Matsuzaki, M., 2004. Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga Cyanidioschyzon merolae 10D. *Nature*.

McAuliffe, K.W., Scotter, D.R., MacGregor, A.N., Earl, K.D., 1982. Casein Whey Wastewater Effects on Soil Permeability1. *Journal of Environment Quality* 11, 31.

Megret, 2015. Production d'hydrogène à partir de déchets.

Mehaia, Cheryan, 1986. Lactic acid from acid whey permeate in a membrane recycle

bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology*.

Mekonnen, Hoekstra, 2010. The green, blue and grey water footprint of farm animals and animal products.

Merola, A., Castaldo, R., Luca, P.D., Gambardella, R., Musacchio, A., Taddei, R., 1981. Revision of Cyanidium caldarium. Three species of acidophilic algae. *Giornale botanico italiano* 115, 189–195.

Ministère de l'agriculture et de l'alimentation, 2019. Stratégie sur les protéines végétales : Didier Guillaume lance la concertation nationale.

Minoda, A., Sawada, H., Suzuki, S., Miyashita, S., Inagaki, K., Yamamoto, T., Tsuzuki, M., 2015. Recovery of rare earth elements from the sulfothermophilic red alga Galdieria sulphuraria using aqueous acid. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99, 1513–1519.

Moon, M., Mishra, S.K., Kim, C.W., Suh, W.I., Park, M.S., Yang, J.-W., 2014. Isolation and characterization of thermostable phycocyanin from Galdieria sulphuraria. *Korean Journal of Chemical Engineering* 31, 490–495.

Mordorintelligence, 2018. Global Plant Protein Market- By Product Type, Application and Geography-Market Shares, Forecasts And Trends (2019 - 2024).

Mordorintelligence, 2017. Nutraceuticals Market Size - Segmented By Type (Functional Foods, Cereal,¬†Bakery and Confectionary, Dairy, Snacks, Others), By Geography (North America, South America, Europe, MEA, APAC) - Growth, Trends and Forecasts (2019 - 2024).

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

Moulin, G., Malige, B., Galzy, P., 1983. Balanced Flora of an Industrial Fermenter: Production of Yeast from Whey. *Journal of Dairy Science* 66, 21–28.

Mühling, M., Belay, A., Whitton, B.A., 2005. Screening Arthrospira (Spirulina) strains for heterotrophy. *J Appl Phycol* 17, 129–135.

Muller-Feuga, Pulz, Brault, 2014. La production de microalgues en conditions contrôlées. *Algorythme 66*.

Mulvihill, Fox, 1989. Caseins and caseinates : manufacture. *Developments in dairy chemistr*y.

Nasseri, A.T., Rasoul-Ami, S., Morowvat, M.H., Ghasemi, Y., 2011. Single Cell Protein: Production and Process. *American Journal of Food Technology* 6, 103–116.

Nicoletti, M., 2016. Microalgae Nutraceuticals. *Foods* 5, 54.

Norton et al., 1994. Kinetic study of continuous whey permeate fermentation by immobilized Lactobacillus helveticus for lactic acid production. *Enzyme and Microbial Technology*.

Nutritionaloutlook, 2018. Food & Beverage, Herbs & Botanicals, Trends & Business.

VII. Références bibliographiques

Oesterhelt, C., Gross, W., 2002. Different Sugar Kinases Are Involved in the Sugar Sensing of Galdieria sulphuraria. *Plant physiology* 128, 291–299.

Oesterhelt, C., Klocke, S., Holtgrefe, S., Linke, V., Weber, A.P.M., Scheibe, R., 2007. Redox Regulation of Chloroplast Enzymes in Galdieria sulphuraria in View of Eukaryotic Evolution. *Plant and Cell Physiology* 48, 1359–1373.

Oesterhelt, Christine, Schmälzlin, E., Schmitt, J.M., Lokstein, H., 2007. Regulation of photosynthesis in the unicellular acidophilic red alga Galdieria sulphuraria†: Regulation of photosynthesis in Galdieria. *The Plant Journal* 51, 500–511.

Oesterhelt, C., Schnarrenberger, C., Gross, W., 1999. Characterization of a sugar/polyol uptake system in the red alga *Galdieria sulphuraria*. *European Journal of Phycology* 34, 271–277.

Onoja, S.O., Omeh, Y.N., Ezeja, M.I., Chukwu, M.N., 2014. Evaluation of the *In Vitro* and *In Vivo* Antioxidant Potentials of *Aframomum melegueta* Methanolic Seed Extract. *Journal of Tropical Medicine* 2014, 1–6.

Pak, W., Takayama, F., Mine, M., Nakamoto, K., Kodo, Y., Mankura, M., Egashira, T., Kawasaki, H., Mori, A., 2012. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of spirulina on rat model of non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*.

Panesar, P.S., Kumari, S., 2011. Lactulose: Production, purification and potential applications. *Biotechnology Advances* 29, 940–948.

Parlement européen et du conseil, 2015. RÈGLEMENT (UE) 2015/2283 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 25 novembre 2015 relatif aux nouveaux aliments, modifiant le règlement (UE) no 1169/2011 du Parlement européen et du Conseil et abrogeant le règlement (CE) no 258/97 du Parlement européen et du Conseil et le règlement (CE) no 1852/2001 de la Commission.

Parlement européen et du conseil, 2005. REGLEMENT (CE) N° 396/2005 DU PARLEMENT EUROPEEN ET DU CONSEIL du 23 février 2005 concernant les limites maximales applicables aux résidus de pesticides présents dans ou sur les denrées alimentaires et les aliments pour animaux d'origine végétale et animale et modifiant la directive 91/414/CEE du Conseil.

Pasotti, L., Zucca, S., Casanova, M., Micoli, G., Cusella De Angelis, M.G., Magni, P., 2017. Fermentation of lactose to ethanol in cheese whey permeate and concentrated permeate by engineered Escherichia coli. *BMC Biotechnology* 17.

Patro, G., Bhattamisra, S., Mohanty, B., Sahoo, H., 2016. In vitro and In vivo Antioxidant evaluation and estimation of total phenolic, flavonoidal content of Mimosa pudica L. *Pharmacognosy Research* 8, 22.

Pesta, Meyer, Winfried, 2007. Utilization of whey. *Springer nature.*

Piccolo, A., 2011. Spirulina a livehood and a business venture.

Piñero Estrada, J., 2001. Antioxidant activity of different fractions of Spirulina platensis

protean extract. *Il Farmaco* 56, 497–500.

Pinto, Albertano, Ciniglia, cozzolino, Pollio, Yoon, H.S., Bhattacharya, D., 2003. Comparative approaches to the taxonomy of the genus Galdieria Merola (Cyanidilae, Rhodophyta). *Cryptogamie Algologie*.

Plank, D., 2016. Making a claim : factors impacting Protein quality and a new way for measuring.

Pravst, I., Žmitek, K., Žmitek, J., 2010. Coenzyme Q10 Contents in Foods and Fortification Strategies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 50, 269–280.

Prazeres, A.R., Carvalho, F., Rivas, J., 2012. Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management* 110, 48–68.

Pruvost, Cornet, Le Borgne, Jenck, 2017. Production industrielle de microalgues et de cyanobactéries p.

Pulz, O., Gross, W., 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. Applied *Microbiology and Biotechnology* 65, 635–648.

Pushparaj, B., Pelosi, E., Tredici, M.R., Pinzani, E., Materassi, R., 1997. An integrated culture system for outdoor production of microlagae and cynobacteria. *Journal of Applied Phycology* 9, 113–119.

Qiu, H., Price, D.C., Weber, A.P.M., Reeb, V., Chan Yang, E., Lee, J.M., Kim, S.Y., Yoon, H.S., Bhattacharya, D., 2013. Adaptation through horizontal gene transfer in the cryptoendolithic red alga Galdieria phlegrea. *Current Biology 23*, R865–R866.

Querques, N., Cesta, M., Santos, R.M., Chiang, Y.W., 2015. Microalgal phycocyanin productivity: strategies for phyco-valorization: Microalgal phycocyanin productivity for phyco-valorization. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 90, 1968–1982.

Radmann, E.M., Reinehr, C.O., Costa, J.A.V., 2007. Optimization of the repeated batch cultivation of microalga Spirulina platensis in open raceway ponds. *Aquaculture* 265, 118–126.

Ramos, O.L., Pereira, R.N., Rodrigues, R.M., Teixeira, J.A., Vicente, A.A., Malcata, F.X., 2016. Whey and Whey Powders: Production and Uses, in: Encyclopedia of Food and Health. *Elsevier, pp*. 498–505.

Reeb, V., Bhattacharya, D., 2010. The Thermo-Acidophilic Cyanidiophyceae (Cyanidiales), in: Seckbach, J., Chapman, D.J. (Eds.), Red Algae in the Genomic Age. *Springer Netherlands, Dordrecht*, pp. 409–426.

Rhie, G., Beale, S.I., 1994. Regulation of Heme Oxygenase Activity in Cyanidium caldarium by Light, Glucose, and Phycobilin Precursors*. *The journal of biological chemistry* 269, 9620–9626.

Ritala, A., Häkkinen, S.T., Toivari, M., Wiebe, M.G., 2017. Single Cell Protein—State-of-the-Art, Industrial Landscape and Patents 2001–2016. *Front. Microbiol*. 8, 2009.

VII. Références bibliographiques

Rito-Palomares, M., Nuñez, L., Amador, D., 2001. Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for c-phycocyanin recovery from *Spirulina maxima*: Aqueous two-phase process for recovery of c-phycocyanin. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 76, 1273–1280.

Romay, Ch., 2003. C-Phycocyanin: A Biliprotein with Antioxidant, Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects. *Current Protein and Peptide Science* 207–216.

Rossoni, Alessandro W, Schönknecht, G., Lee, H.J., Rupp, R.L., Flachbart, S., Mettler-Altmann, T., Weber, A.P.M., Eisenhut, M., 2018. Changes in Gene Expression and Involvement of Horizontally Acquired Genes 31.

Rossoni, Alessandro W., Schönknecht, G., Lee, H.J., Rupp, R.L., Flachbart, S., Mettler-Altmann, T., Weber, A.P.M., Eisenhut, M., 2018. Cold Acclimation of the Thermoacidophilic Red Alga Galdieria sulphuraria - Changes in Gene Expression and Involvement of Horizontally Acquired Genes. *Plant Cell Physiol*.

Roy-Lachapelle, A., Solliec, M., Bouchard, M., Sauvé, S., 2017. Detection of Cyanotoxins in Algae Dietary Supplements. *Toxins* 9, 76.

Rutherfurd, S.M., Bains, K., Moughan, P.J., 2012. Available lysine and digestible amino acid contents of proteinaceous foods of India. *British Journal of Nutrition* 108, S59–S68.

Rutherfurd, S.M., Fanning, A.C., Miller, B.J., Moughan, P.J., 2015. Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Scores and Digestible Indispensable Amino Acid Scores Differentially Describe Protein Quality in Growing Male Rats. *Journal of Nutrition* 145, 372–379.

Sakakibara, Fukuda, Sekita, Nishihashi, Hirahashi, 2008. Process for treating Spirulina. *US* 7,326,558 B2.

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

Santiago-morales, 2018. Tocopherols, phycocyanin and superoxide dismutase from microalgae : as potential food antioxidants. *Applied Food Biotechnology*.

Sarian, F.D., Rahman, D.Y., Schepers, O., van der Maarel, M.J.E.C., 2016. Effects of Oxygen Limitation on the Biosynthesis of Photo Pigments in the Red Microalgae Galdieria sulphuraria Strain 074G. *PLOS ONE* 11, e0148358.

Satia, J.A., Littman, A., Slatore, C.G., Galanko, J.A., White, E., 2009. Long-term Use of -Carotene, Retinol, Lycopene, and Lutein Supplements and Lung Cancer Risk: Results From the VITamins And Lifestyle (VITAL) Study. *American Journal of Epidemiology* 169, 815–828.

Satyanarayana, P., Mishra, G., Suresh, 2007. Crystal Structure Of C-Phycocyanin From Phormidium, Lyngbya Spp. (Marine) And Spirulina Sp. (Fresh Water) Shows Two Different Ways Of Energy Transfer Between Two Hexamers.

Sauer, Tanner, 1989. The hexose carrier from Chlorella cDNA cloning of eucaryotic H+ -

cotransport. *Z Pflanzenphysiol*.

Schaafsma, G., 2000. The protein digestibility-corrected amino acid score. *The journal of nutrition.*

Schmidt, R.A., Wiebe, M.G., Eriksen, N.T., 2005. Heterotrophic high cell-density fed-batch cultures of the phycocyanin-producing red algaGaldieria sulphuraria. *Biotechnology and Bioengineering* 90, 77–84.

Schonknecht, G., Chen, W.-H., Ternes, C.M., Barbier, G.G., Shrestha, R.P., Stanke, M., Brautigam, A., Baker, B.J., Banfield, J.F., Garavito, R.M., Carr, K., Wilkerson, C., Rensing, S.A., Gagneul, D., Dickenson, N.E., Oesterhelt, C., Lercher, M.J., Weber, A.P.M., 2013. Gene Transfer from Bacteria and Archaea Facilitated Evolution of an Extremophilic Eukaryote. *Science* 339, 1207–1210.

Schowen, R.L., 1993. Principles of biochemistry 2nd ed. (Lehninger, Albert L.; Nelson, David L.; Cox, Michael M.). *Journal of Chemical Education* 70, A223.

Schultz, N., Chang, L., Hauck, A., Reuss, M., Syldatk, C., 2006. Microbial production of single-cell protein from deproteinized whey concentrates. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69, 515–520.

Schwabe, 1936. Über einige Blaualgen aus dem mittleren und südlichen Chile.

Schwerna, P., 2015. Comparison between hetero- and mixotrophic cultivation of the alga Galdieria sulphuraria using crude glycerol as a carbon source.

Segueilha, Le ruyet, Delaroche, 2015. Method for fed-batch fermentation of chlorellae fed by sequential, automated provisions of glucose. WO2015/011428A1.

Sekar, S., Chandramohan, M., 2008. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. *Journal of Applied Phycology* 20, 113–136.

Sentsova, O.Yu., 1994. The study of Cyanidiophyceae in Russia, in: Seckbach, J. (Ed.), Evolutionary Pathways and Enigmatic Algae: Cyanidium Caldarium (Rhodophyta) and Related Cells. *Springer Netherlands, Dordrecht*, pp. 167–174.

Sguera, 2008. Spirulina platensis et ses constituants interets nutritionnels et activités thérapeutiques.

Shao, W., Ebaid, R., El-Sheekh, M., Abomohra, A., Eladel, H., 2019. Pharmaceutical applications and consequent environmental impacts of Spirulina (Arthrospira): *An overview. Grasas y Aceites* 70, 292.

Shimamatsu, H., 2004. Mass production of Spirulina, an edible microalga. *Hydrobiologia* 512, 39–44.

Singh Yadav, J.S., 2014. La production de protéines unicellulaires cractérisation et récupération des protéines de lactosérum du lactosérum fermenté. Québec.

Siso, M.I.G., 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresource*

Technology 57, 1–11.

Skuja, 1970. Alghe cavernicole nelle zone illuminate delle Grotte di Castellana (Murge di Bari). La grotte d'Italia.

Sloth, J.K., Jensen, H.C., Pleissner, D., Eriksen, N.T., 2017. Growth and phycocyanin synthesis in the heterotrophic microalga Galdieria sulphuraria on substrates made of food waste from restaurants and bakeries. *Bioresource Technology* 238, 296–305.

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

Smith, 2008. Dried dairy ingredient. Wisconsin Center for dairy Research.

Smithers, G.W., 2008. Whey and whey proteins—From 'gutter-to-gold.' *International Dairy Journal* 18, 695–704.

Soletto et al., 2005. Batch and fed-batch cultivations of Spirulina platensis using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. *Aquaculture.*

Sonani, R.R., 2016. Recent advances in production, purification and applications of phycobiliproteins. *World Journal of Biological Chemistry* 7, 100.

Soni, R.A., Sudhakar, K., Rana, R.S., 2017. Spirulina – From growth to nutritional product: A review. *Trends in Food Science & Technology* 69, 157–171.

Sorensen, L., Hantke, A., Eriksen, N.T., 2013. Purification of the photosynthetic pigment C-phycocyanin from heterotrophic *Galdieria sulphuraria*: Purification of C-phycocyanin from *Galdieria sulphuraria*. J*ournal of the Science of Food and Agriculture* 93, 2933–2938.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101, 87–96.

Stadler, R., Sauer, N., 1996. The *Arabidopsis thaliana AtSUC2* Gene is Specifically Expressed in Companion Cells. *Botanica Acta* 109, 299–306.

Stadnichuk, I.N., Rakhimberdieva, M.G., Bolychevtseva, Y.V., Yurina, N.P., Karapetyan, N.V., Selyakh, I.O., 1998. Inhibition by glucose of chlorophyll a and phycocyanobilin biosynthesis in the unicellular red alga Galdieria partita at the stage of coproporphyrinogen III formation. *Plant Science* 136, 11–23.

Stanke, M., Waack, S., 2003. Gene prediction with a hidden Markov model and a new intron submodel. *Bioinformatics* 19, ii215–ii225.

Synadiet, 2016. Les compléments alimentaires [WWW Document]. URL http://www.synadiet.org/les-complements-alimentaires/le-marche/les-chiffres-du-marche-en-2016 (accessed 3.23.18).

Tardu, M., Dikbas, U.M., Baris, I., Kavakli, I.H., 2016. RNA-seq analysis of the transcriptional response to blue and red light in the extremophilic red alga, Cyanidioschyzon merolae.

F*unctional & Integrative Genomics* 16, 657–669.

Tejayadi, Cheryan, 1995. Lactic acid from cheese whey permeate. Productivity and economics of a continuous membrane bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*.

Ternes, 2015. Metabolic evolution in Galdieria sulphuraria. Oklahoma State university.

Tessari, P., Lante, A., Mosca, G., 2016. Essential amino acids: master regulators of nutrition and environmental footprint? *Sci Rep* 6, 26074.

The world Economic Forum, 2019. Meat : the Future series Alternative Proteins.

Tian-Yuan, Z., Yin-Hu, W., Lin-Lan, Z., Xiao-Xiong, W., Hong-Ying, H., 2014. Screening heterotrophic microalgal strains by using the Biolog method for biofuel production from organic wastewater. *Algal Research* 6, 175–179.

Trapnell, C., Williams, B.A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., van Baren, M.J., Salzberg, S.L., Wold, B.J., Pachter, L., 2010. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology* 28, 511–515.

Troxler, R.F., Lin, S., Offner, G.D., 1989. Heme Regulates Expression of Phycobiliprotein Photogenes in the Unicellular Rhodophyte, Cyanidium caldarium*. *The journal of biological chemistry* 264, 20596–20601.

USDA, 2014. Whey to ethanol : a biofuel role for dairy cooperatives?

Virgnaud, et al., 1960. Methd of preparing alimentary lactic yeasts. US2940859A.

Vonshak, 2014. Spirulina Platensis Arthrospira: Physiology, *Cell-Biology And Biotechnology*. Taylor & Francis.

Walter, A., 2011. Study of phycicyanin Production from Spirulina platensis under different light spectra. Brazilian archives of biology and technology 54, 675–682.

Walter, A., Carvalho, J.C. de, Soccol, V.T., Faria, A.B.B. de, Ghiggi, V., Soccol, C.R., 2011. Study of phycocyanin production from Spirulina platensis under different light spectra. Brazilian *Archives of Biology and Technology* 54, 675–682.

Wan, M., Wang, Z., Zhang, Z., Wang, J., Li, S., Yu, A., Li, Y., 2016a. A novel paradigm for the high-efficient production of phycocyanin from Galdieria sulphuraria. *Bioresource Technology* 218, 272–278.

Wan, M., Wang, Z., Zhang, Z., Wang, J., Li, S., Yu, A., Li, Y., 2016b. A novel paradigm for the high-efficient production of phycocyanin from Galdieria sulphuraria. *Bioresource Technology* 218, 272–278.

Watanabe, F., 2007. Vitamin B $_{12}$ Sources and Bioavailability. *Exp Biol Med* (Maywood) 232, 1266–1274.

Weber, A., Oesterhelt, C., Gross, W., Br**?**utigam, A., Imboden, L., Krassovskaya, I., Linka,

N., Truchina, J., Schneidereit, J., Voll, H., Voll, L., Zimmermann, M., Jamai, A., Riekhof, W., Yu, B., Garavito, R., Benning, C., 2004. EST-analysis of the thermo-acidophilic red microalga Galdieriasulphuraria reveals potential for lipid A biosynthesis and unveils the pathway of carbon export from rhodoplasts. *Plant Molecular Biology* 55, 17–32.

Wood, S.A., Maier, M.Y., Puddick, J., Pochon, X., Zaiko, A., Dietrich, D.R., Hamilton, D.P., 2017. Trophic state and geographic gradients influence planktonic cyanobacterial diversity and distribution in New Zealand lakes. *FEMS Microbiology Ecology* 93, fiw234.

Wood, S.A., Selwood, A.I., Rueckert, A., Holland, P.T., Milne, J.R., Smith, K.F., Smits, B., Watts, L.F., Cary, C.S., 2007. First report of homoanatoxin-a and associated dog neurotoxicosis in New Zealand. *Toxicon* 50, 292–301.

Wu, L., Ho, J.A., Shieh, M.-C., Lu, I.-W., 2005. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Spirulina and Chlorella Water Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 4207–4212.

Xing, W., Huang, W., Li, D., Liu, Y., 2007. Effects of Iron on Growth, Pigment Content, Photosystem II Efficiency, and Siderophores Production of Microcystis aeruginosa and Microcystis wesenbergii. *Current Microbiology* 55, 94–98.

Yadav, J.S.S., Bezawada, J., Ajila, C.M., Yan, S., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., 2014. Mixed culture of Kluyveromyces marxianus and Candida krusei for single-cell protein production and organic load removal from whey. *Bioresource Technology* 164, 119–127.

Yang, S.-Y., Jones, J.H., Olsen, F.J., Paterson, J.J., 1980. Soil as a Medium for Dairy Liquid Waste Disposal. *Journal of Environment Quality* 9, 370.

Ye, C., Mu, D., Horowitz, N., Xue, Z., Chen, J., Xue, M., Zhou, Y., Klutts, M., Zhou, W., 2018. Life cycle assessment of industrial scale production of spirulina tablets. *Algal Research* 34, 154–163.

Zarrouk, 1966. Contribution à l'étude d'une cyanophycee. Influence de diverse facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de Spirulina maxima (Setch et Gardner) Geitler.

Zeinalian, R., Farhangi, M.A., Shariat, A., Saghafi-Asl, M., 2017. The effects of Spirulina Platensis on anthropometric indices, appetite, lipid profile and serum vascular endothelial growth factor (VEGF) in obese individuals: a randomized double blinded placebo controlled trial. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 17.

Zhou, Y., Qu, H., Dibley, K.E., Offler, C.E., Patrick, J.W., 2007. A suite of sucrose transporters expressed in coats of developing legume seeds includes novel pH-independent facilitators: Novel sucrose transporters expressed in legume seed coats. *The Plant Journal* 49, 750–764.

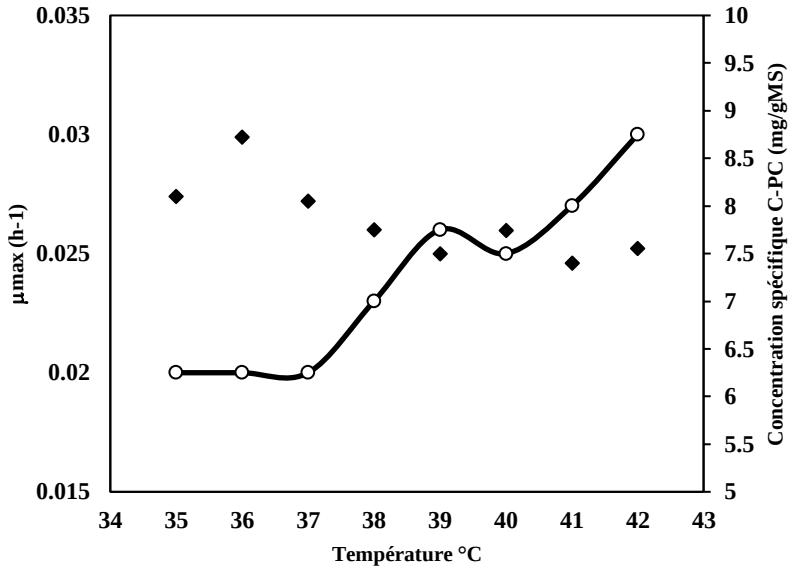
Zulueta, A., Esteve, M.J., Frígola, A., 2009. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry* 114, 310–316.

VIII. ANNEXES

VIII. Annexes

Annexe 1. Effet de la température sur la croissance et la production en C-PC de la souche FCC3432

La souche *G. sulphuraria* étant capable de croître à des température allant jusqu'à 50°C et étant couramment cultivée à des température de 40-42°C dans la littérature (Schmidt et al., 2005; Sloth et al., 2017, 2006), un suivi de croissance et de production de C-PC a été réalisé sur la souche FCC3432 cultivée en mode batch en hétérotrophie sur un milieu PDL en bioréacteur.



Effet de la température sur la croissance et la concentration spécifique en C-PC de la souche FCC3432 en hétérotrophie. (rond blanc) µmax, (losange noir) Concentration spécifique en C-PC.

Le meilleur taux de croissance de la souche FCC3432 est situé à 42°C et la concentration spécifique en C-PC n'évolue que très peu en fonction de la température (7,4 et 8,7 mg/gMS). Le taux de croissance influençant grandement la productivité r_{MS} du procédé de production et par extension la productivité en C-PC, la température de culture a été fixée à 42°C pour les procédés de production de la souche FCC3432.

Annexe 2. Suivi de croissance de la souche FCC3222 en présence de peptone de caséine

La souche FCC3222 est cultivée sur un milieu avec du lactose pur avec 1, 2 ou 4 g/l de PEP (peptone de caséine de lait).

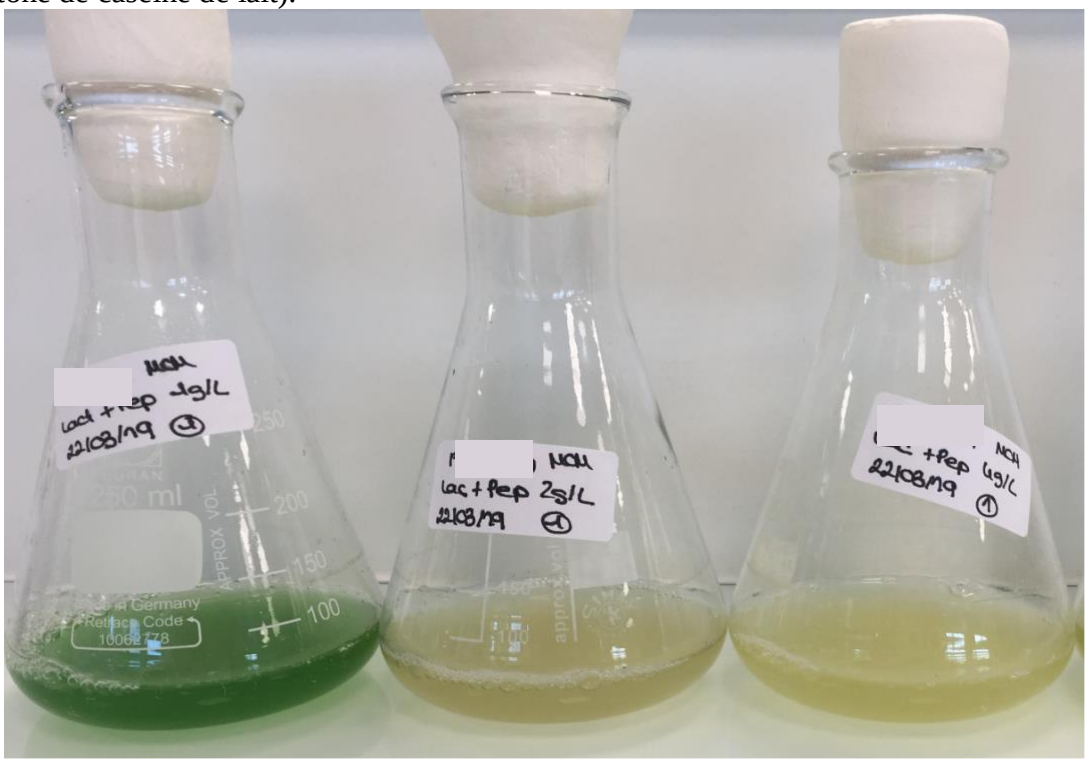
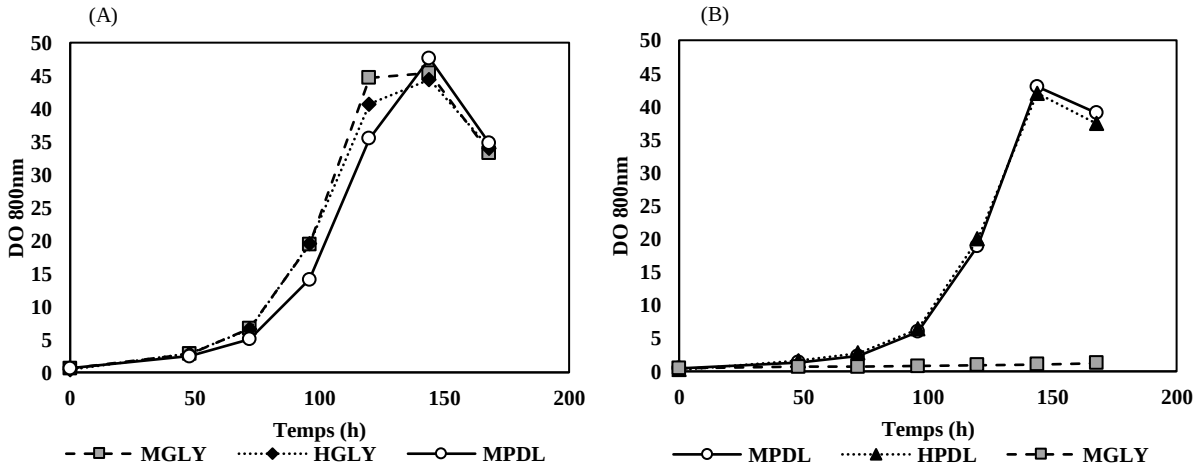


Photo prise en fin de culture permettant de constater l'effet inhibiteur de la PEP sur la production de C-PC

Annexe 3. Comparatif de croissance de la souche FCC3222 avant les essais de transport

Trois conditions de pré-cultures différentes de la souche FCC3222 ont été utilisées pour inoculer un milieu glycérol. La première pré-culture a été réalisée en mixotrophie sur un milieu glycérol (MGLY), la deuxième a été cultivée en hétérotrophie sur un milieu glycérol (HGLY) et la troisième en mixotrophie sur un milieu perméat de lait (MPDL).
Une expérience similaire a été réalisée sur le milieu PDL en utilisant des pré-cultures réalisées soit en mixotrophie sur un milieu PDL (MPDL), soit en hétérotrophie sur un milieu PDL (HPDL) ou en mixotrophie sur un milieu glycérol (MGLY).
Dans toutes les conditions, le suivi de la croissance a été réalisé en hétérotrophie avec des Erlenmeyers placés dans un incubateur à 37°C avec une agitation de 140 rpm.



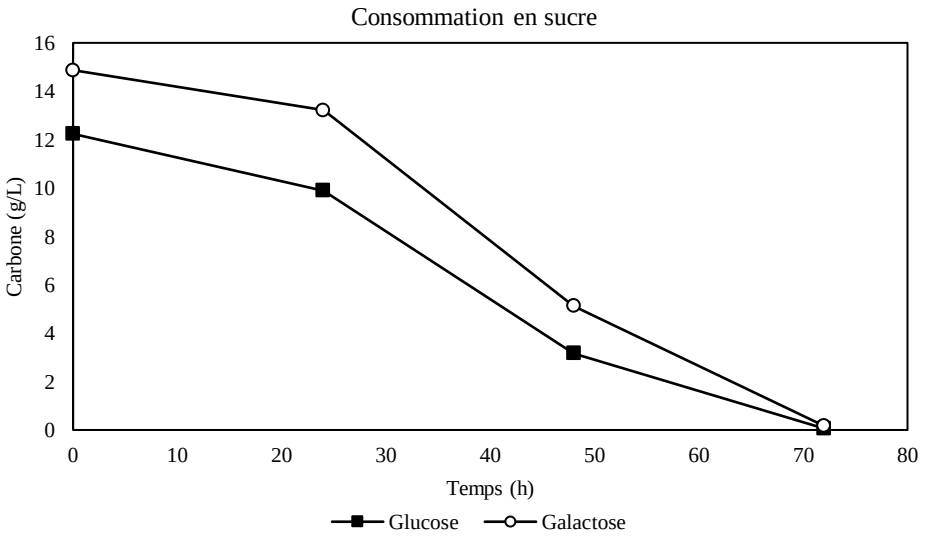
Suivi de la croissance en hétérotrophie de la souche FCC3222 sur un milieu A) Glycérol et B) PDL. Les suspensions cellulaires servant d'inoculum sont issues de différentes conditions de pré-culture MGLY : Mixotrophie Glycérol ; HGLY : Hétérotrophie Glycérol ; MPDL : Mixotrophie PDL ; HPDL : Hétérotrophie PDL.

Dans le milieu glycérol, la souche FCC3222 se développe de manière similaire quelle que soit l'origine de la pré-culture (Fig. A). Sur le milieu PDL, la densité cellulaire de la souche habituée à croître sur glycérol (MGLY) stagne à une DO aux alentours de 1, tout le temps de l'essai, ce qui indique une absence de croissance. A l'inverse, si les pré-cultures sont développées sur un milieu PDL (MPDL ou HPDL), les suspensions cellulaires ont une croissance exponentielle (Fig. B).

Pour chacune des conditions testées, le suivi de la consommation des substrats par HPLC a indiqué que la concentration du substrat carboné (glycérol ou lactose) diminue au cours de la culture, excepté pour la condition MGLY sur un milieu PDL pour laquelle aucune consommation de lactose n'a été mesurée. Ceci confirme l'incapacité des cellules préalablement cultivées sur MGLY à consommer le lactose dans les 175 premières heures de culture.

VIII. Annexes

Annexe 4. *Co-consommation du glucose et du galactose par la souche FCC3222*



Suivi de la consommation des sucres sur un milieu de culture contenant du glucose et galactose