

ANNÉE 2016

N° 054

THÈSE
pour le
DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
par

Benjamin Moutel

Présentée et soutenue publiquement le 24 octobre 2016

Etude de l'intérêt pharmaceutique et d'une
production industrielle des lipides issus de la
microalgue *Botryococcus braunii*

Président : M. Alain Pineau, PU-PH, Université de Nantes

Membres du jury : Mme Gaëtane Wielgosz-Collin, MCU-HDR, Université de Nantes
M. Olivier Gonçalves, MCU, Université de Nantes

Remerciements

Je souhaite exprimer tout d'abord mes remerciements à ma directrice de thèse, Gaëtane, pour sa patience et sa compréhension.

Je suis très heureux de soutenir cette thèse en présence de Monsieur Alain PINEAU car c'est une belle occasion de clôturer mes années étudiantes. Je le remercie d'avoir été, pendant ces années, présent, constant, juste et amical.

Je remercie encore une fois Olivier Gonçalves d'être présent pour cette nouvelle soutenance.

Et je remercie bien sûr la famille. Le fiston Armel, Sophie et le futur fiston. Et aussi papa, maman, frère Vincent, beau-papa, belle-maman, beauf Denis et Sabine, les neveux et nièces et les copains !

Sommaire

Remerciements	2	
Sommaire	3	
Introduction	7	
Chapitre I	<i>B. braunii</i>, microalgue originale	9
I.1	Les algues	9
I.1.1	Définition des algues	9
I.1.1	Classification des algues	10
a	Les organismes procaryotes photosynthétiques	10
b	Les organismes eucaryotes photosynthétiques	12
i.	Les glaucophytes	15
ii.	Les algues rouges	15
iii.	Les plantes vertes	16
I.2	Les microalgues	18
I.2.1	Ultrastructure des algues	18
I.2.2	Contenu biochimique des microalgues	19
I.3	Biologie de la microalgue <i>Botryococcus braunii</i>	21
I.3.1	Classification de <i>B. braunii</i>	21
I.3.2	Habitat naturel	22
I.3.3	Morphologie	23
I.3.4	Localisation et rôle des hydrocarbures	27
Chapitre II	Lipides à potentiel pharmaceutique de la microalgue <i>B. braunii</i>	29
II.1	Les lipides d'origine naturelle	29
a	Définitions des lipides	29
b	Lipides neutres	30
i.	Dérivés d'acides gras	30
ii.	Dérivés terpéniques (isoprénoïdes, terpénoïdes)	33
iii.	Dérivés d'acides aminés	37
c	Lipides polaires	37
i.	Lipides complexes (au moins trois constituants)	37

ii.	Polykétides	38
iii.	Phénylpropanoïdes	39
II.1.2	Les hydrocarbures d'origine biologique	43
a	Répartition des hydrocarbures volatils	43
i.	Hydrocarbures volatils dérivés d'acides aminés	43
ii.	Hydrocarbures volatils dérivés d'acide gras	44
iii.	Hydrocarbures terpéniques volatils	44
b	Répartition des hydrocarbures non volatils	45
i.	Hydrocarbures non terpéniques	45
ii.	Hydrocarbures terpéniques	46
iii.	Hydrocarbures aromatiques	47
c	Le pétrole brut : hydrocarbures des sédiments d'origine biologique	48
II.2	Les lipides de l'espèce <i>Botryococcus braunii</i>	49
II.2.1	Les lipides classiques chez <i>B. braunii</i>	50
a	Acides gras	50
b	Stérols	51
c	Caroténoïdes	51
II.2.2	Hydrocarbures	52
a	Race A : hydrocarbures linéaires insaturés	53
i.	Quantités produites	53
ii.	Structures des hydrocarbures de race A	54
iii.	Biosynthèse	55
b	Hydrocarbures de race B	55
i.	Quantités produites	55
ii.	Structures des hydrocarbures de race B	56
iii.	Biosynthèse	57
c	Hydrocarbures de race L	58
i.	Quantités produites	58
ii.	Structure des hydrocarbures de race L	59
iii.	Biosynthèse	59
II.2.3	Lipides originaux de <i>B. braunii</i>	59
a	Les botryals, aldéhydes gras α -branchés (race A)	59
b	Braunicétals : terpène et aldéhyde macrocyclique reliés par liaison acétal (race B et L)	60
c	Alkylphénols de <i>B. braunii</i> (race A principalement)	61
d	Epoxydes (A, B, L)	62
II.2.4	Polymères et macromolécules de l'espèce <i>B. braunii</i>	64
a	Polymères polyaldéhydes (A, B, L) : réseau de base de la matrice	64
b	Polymères polyacétals (B, L)	64

c	Polyéthers (A, B, L) : macromolécules insérées dans le polymère	65
i.	Polyéthers de la race A	66
ii.	Polyéthers de la race B	67
iii.	Polyéthers de la race L	67
d	L'algaenan	68
e	Bilan sur les lipides de <i>B. braunii</i>	69
Chapitre III	Culture de la microalgue <i>B. braunii</i> en vue d'une production industrielle de ses lipides d'intérêt	74
III.1	La culture des microalgues en photobioréacteur	74
III.1.1	Photosynthèse et respiration	74
a	Définition d'un microorganisme photosynthétique	74
b	Photosynthèse	75
c	Respiration	77
III.1.2	Besoins nutritifs et paramètres physiques de culture	77
a	Le carbone	77
b	L'Azote	78
c	Le phosphore	79
d	Autres micronutriments et macronutriments, et chélatants	79
e	La lumière	80
i.	Réponse biochimique	80
ii.	Réponse photosynthétique	80
iii.	Atténuation de la lumière	81
f	Le pH	84
g	La température	85
III.1.3	Systèmes de culture	85
i.	Systèmes ouverts	85
ii.	Systèmes clos	86
III.1.4	Modes de culture	91
a	Mode discontinu	91
b	Mode continu	94
c	Mode semi-continu	95
d	Productivité volumique et productivité surfacique	95
III.2	Culture de <i>B. braunii</i> en photobioréacteur	98
III.2.1	Paramètres de culture de <i>B. braunii</i>	99
a	Paramètres chimiques	99
i.	Milieux de culture utilisés	99
ii.	Phosphates	99
iii.	Sources d'azote	100

iv.	Carbone inorganique et pH	100
v.	NaCl	101
vi.	Métaux	101
vii.	Vitamines	101
b	Paramètres physiques	101
i.	Température	101
ii.	Intensité lumineuse	102
iii.	Agitation	102
c	Paramètres biologiques	103
i.	Influence de la souche	103
ii.	Cultures associées	103
III.2.2	Exemples de cultures de la microalgue <i>B. braunii</i> en photobioréacteur	
	104	
a	Culture batch typique	104
i.	Phase de latence	104
ii.	Phase exponentielle	104
iii.	Phase stationnaire	105
b	Cultures standard en fiole Erlenmeyer	106
c	Cultures en photobioréacteur airlift	107
d	Photobioréacteurs utilisés pour les cultures de <i>B. braunii</i>	109
e	Production à grande échelle en photobioréacteur	111
i.	Contaminations	112
ii.	Coûts	112
Conclusion	114	
Bibliographie	116	
Liste des abréviations		130
Liste des figures		132
Liste des tableaux		134

Introduction

La rédaction de ce mémoire fait suite à la soutenance de ma thèse de doctorat. Dans le cadre de cette dernière, les travaux de recherche avaient pour but de produire des lipides à visée biocarburant à partir de la microalgue *Botryococcus braunii*. Cette thèse était axée sur la biologie, la chimie et les bioprocédés à l'échelle laboratoire, destinés à optimiser la production d'une telle huile.

Il est clair que cette espèce algale possède une capacité unique de produire des hydrocarbures et de les accumuler en abondance. Elle a donc été étudiée depuis des décennies pour l'exploitation de ses hydrocarbures comme une source d'énergie potentielle. Ces dernières années, un regain d'intérêt pour la production de biocarburants à partir d'algues a été porté par la montée du prix du pétrole brut. Même si aujourd'hui le prix du baril a chuté, les algues conservent un intérêt incontournable dans le domaine de l'énergie mais il faut encore plus qu'hier trouver d'autres débouchés à la culture d'algues.

La découverte et la production de molécules d'intérêt pharmaceutique font partie de ces débouchés. Ce type de composés à haute valeur ajoutée pourrait permettre de rentabiliser une production d'algues. Afin de pérenniser des savoir-faires et des années de recherche appliquée, il est important que de tels débouchés soient trouvés en explorant toutes les applications potentielles des biomolécules d'une espèce d'algue. Cette approche dite de « raffinerie biologique », ou « bioraffinerie », qui consiste en un fractionnement d'une biomasse et l'exploitation de chacune des fractions fait l'objet de nombreux travaux de recherche dans le domaine des microalgues.

Ce mémoire propose donc une étude bibliographique du potentiel pharmaceutique de la fraction lipidique de la microalgue *B. braunii*. C'est une microalgue verte. Les microalgues sont des organismes vivants extrêmement anciens et, à ce titre, producteurs d'une extrême variété de biomolécules. Les microalgues sont donc un vivier pour la découverte de composés bioactifs. *B. braunii* est très étudiée pour son potentiel industriel pour la production de biocarburant. Elle l'est beaucoup moins pour des applications en pharmacie ou cosmétique.

Nous considérerons la fraction lipidique de *B. braunii*, avec une définition très large des lipides. A chaque famille de lipides seront associées des activités biologiques exploitées par l'industrie pharmaceutique. En faisant le parallèle avec les familles de lipides produites par *B. braunii*, nous nous permettrons de proposer un bilan du potentiel pharmaceutique des lipides de *B. braunii*. Il en ressort que des applications récentes en nanomédecine avec l'utilisation du squalène ou d'hydrocarbures insaturés serait une voie très prometteuse pour les hydrocarbures de *B. braunii*.

Enfin, une étude bibliographique des conditions et procédés de culture de *B. braunii* a été réalisée. Elle permet de compléter l'étude de cette microalgue jusqu'à en proposer les outils et paramètres nécessaires à la production optimisée de ses lipides d'intérêt.

Chapitre I *B. braunii*, microalgue originale

Les algues sont parmi les organismes vivants les plus anciens existant sur Terre. Dû à leur grand âge et à leurs différenciations successives, elles possèdent une diversité biochimique extrêmement large. Cela en fait une source potentielle extraordinaire de molécules bioactives. *B. braunii* est une microalgue verte eucaryote et possède des caractéristiques biologiques et chimiques uniques. En particulier, sa croissance est lente et elle accumule des hydrocarbures à longue chaîne.

I.1 Les algues

I.1.1 Définition des algues

Il est très difficile de donner une définition simple de ce que « les algues » désignent. Elles ne constituent pas un groupe monophylétique. Il n'est pas aisé de les décrire comme une entité unique car c'est un groupe très hétérogène (Graham *et al.*, 2009). La biodiversité des algues est énorme. Le nombre d'espèces est très grand et beaucoup d'espèces n'auraient pas encore été décrites (Norton *et al.*, 1996). Leur diversité biochimique est également très large, de nombreuses voies biochimiques originales existent chez les algues. Leur rôle écologique est très important, la diversité de leurs morphologies, etc.

Ce sont les premiers organismes photosynthétiques de la planète. Elles participent à la moitié de la productivité photosynthétique de la Terre, principalement dans les océans (Falkowski and Raven, 2007).

Elles vivent le plus souvent dans un environnement aqueux. Certaines algues vivent sur un support (une plante, une roche, un sol, la neige...), d'autres sont mobiles, d'autres encore dérivent dans un milieu aqueux. Certaines vivent en symbiose avec d'autres organismes (coraux, lichens, vers plats...) (Graham *et al.*, 2009; Reisser, 1992).

La croissance des algues suit souvent le cycle des saisons. La croissance rapide d'une espèce se manifeste puis une autre espèce lui succède. Les blooms printaniers de diatomées sont par exemple très prévisibles. Le reste du temps, temps de « latence », il est parfois difficile voire impossible de repérer une espèce dans le milieu extérieur (Andersen, 2005).

Les algues peuvent être procaryotes, eucaryotes, unicellulaires ou pluricellulaires. Lorsqu'elles sont eucaryotes, elles peuvent avoir un ou plusieurs chloroplastes et elles ont toutes des mitochondries, un appareil de Golgi, un reticulum endoplasmique, et d'autres organites typiques des eucaryotes (Graham *et al.*, 2009).

I.1.1 Classification des algues

a Les organismes procaryotes photosynthétiques

Les seuls procaryotes qui utilisent la photosynthèse de type « plante » sont les cyanobactéries (Holland, 2006). L'oxydation de l'eau en oxygène au cours de cette photosynthèse est une propriété qui les sépare totalement des autres procaryotes photosynthétiques, les bactéries pourpres et vertes. Les cyanobactéries appartiennent au groupe des bactéries (Gram négatives).

Les cyanobactéries constituent un groupe génétiquement et morphologiquement très hétérogène. Certaines sont unicellulaires, sphériques ou en bâtonnets, d'autres sont filamenteuses. Leur seul point commun est l'utilisation de la photosynthèse de type « plante », ce qui leur a valu pendant longtemps d'être classées dans les algues.

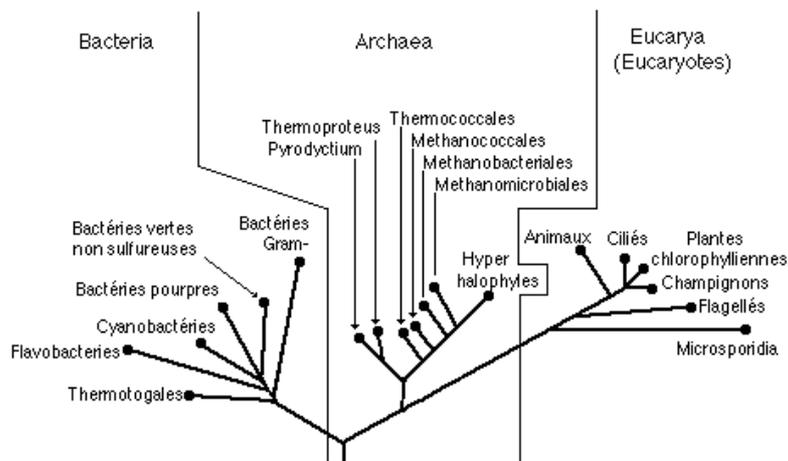


Figure 1 : arbre phylogénétique universel distinguant 3 grands domaines du monde vivant : Bacteria, Archaea et Eucarya. Les cyanobactéries sont situées dans le domaine des Bacteria au côté des deux autres groupes de bactéries photosynthétiques (Woese *et al.*, 1990).

Des fossiles procaryotiques de cyanobactéries ont été retrouvés dans des sédiments d'environ 3,8 milliard d'années. Les cyanobactéries représentent donc le plus ancien groupe d'algues. Et la photosynthèse existe donc au moins depuis cette période (Buick, 2008; Russell and Hall, 2006). L'oxygène relargué et accumulé au cours des âges par ces organismes a fondamentalement modifié la vie sur la Terre (Falkowski and Knoll, 2007). Les cyanobactéries transforment une atmosphère jusqu'alors réductrice en une atmosphère oxydante (Holland, 2006). L'oxygène s'accumule dans l'atmosphère, permettant aux organismes aérobies de se développer peu à peu. Ce « nouvel » accepteur d'électrons, puissant (pouvant collecter plus d'énergie) et présent en abondance, permet à des écosystèmes plus productifs de se développer et se maintenir. Il permet aussi de voir se développer des formes de vie de plus en plus complexes (Catling *et al.*, 2005) et de nouvelles voies biochimiques (Falkowski, 2006; Raymond and Segrè, 2006).

Du point de vue cytologique et biochimique, les cyanobactéries sont similaires aux bactéries. La plupart des cyanobactéries possède de la chlorophylle a, de la phycocyanine et de la phycoérythrine. La chlorophylle b et d, et d'autres dérivés des chlorophylles a et b sont aussi retrouvés chez ces algues. Les cyanobactéries stockent leur énergie sous forme d'amidon, principalement sous forme de polyglycanes avec liaisons α -1,4.

Certaines espèces sont produites commercialement (la spiruline *Athrospira* sp.), d'autres produisent des toxines qui peuvent être toxiques pour l'homme (ex. *Microcystis* sp) (Chisholm *et al.*, 1992).

b Les organismes eucaryotes photosynthétiques

Les organismes eucaryotes se sont développés après les procaryotes. La compartimentation des cellules serait une conséquence directe de l'augmentation de l'oxygène atmosphérique et aurait permis de préserver l'activité biochimique de chaque compartiment cellulaire de la pression en oxygène de leur environnement (Acquisti *et al.*, 2007; Gross and Bhattacharya, 2010).

Les traces des premières grandes lignées eucaryotes sont retrouvées à partir de l'ère paléoprotérozoïque (entre 2,5 et 1,6 Milliard d'années). Mais la diversité des organismes explose vers 800 millions d'années (néoprotérozoïque). C'est à cette période que les océans relarguent une grande quantité d'oxygène (De Clerck *et al.*, 2012; Knoll *et al.*, 2006).

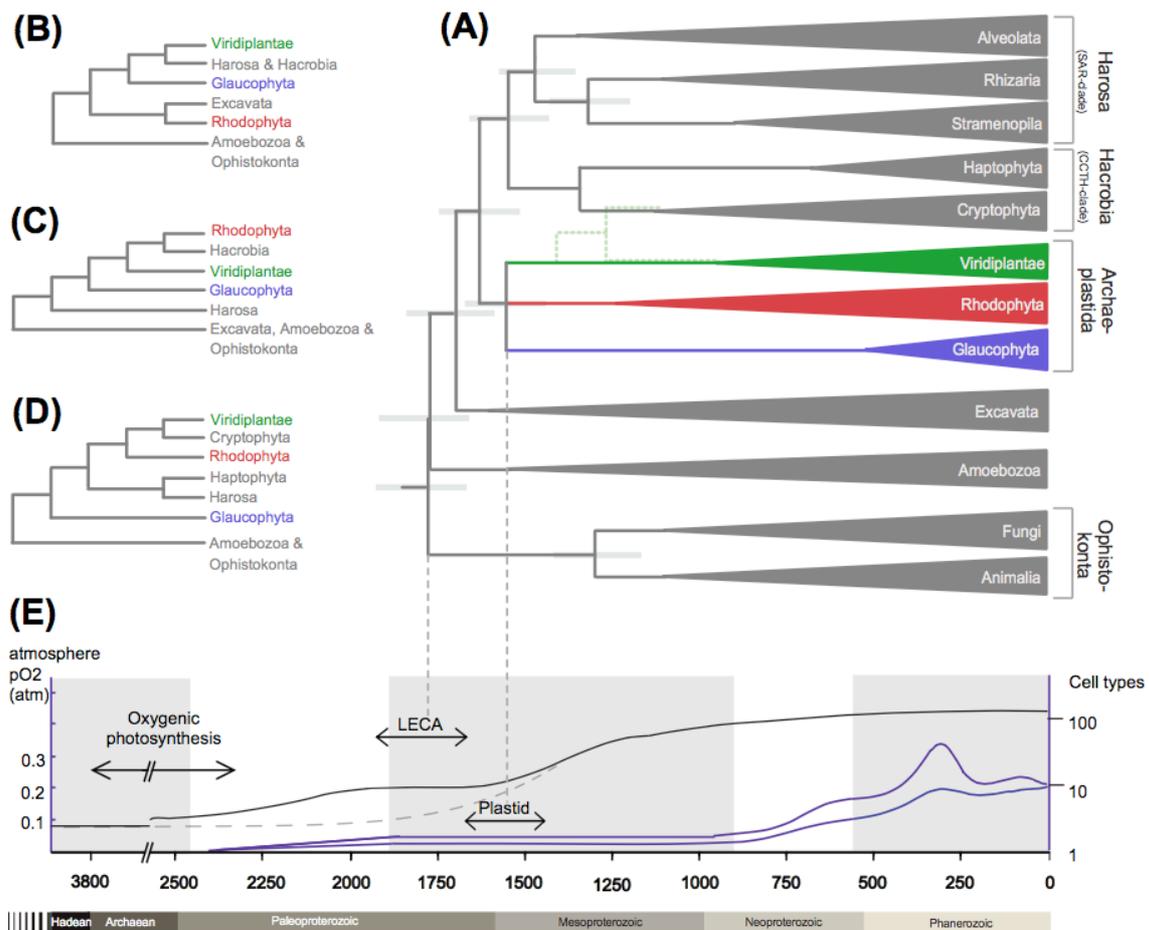


Figure 2 : relation entre les grands groupes d'algues et les principaux groupes d'eucaryotes et corrélation entre l'augmentation dans l'atmosphère et l'évolution de la complexité des organismes vivants (De Clerck *et al.*, 2012).

Les organismes eucaryotes photosynthétiques sont généralement classés en trois supergroupes d'organismes (glaucophytes, algues rouges, plantes vertes) et une monophylie entre ces 3 supergroupes est souvent acceptée. Ce groupe monophylétique est parfois appelé *Archaeplastida* (Price *et al.*, 2012). Les 3 super-groupes possèdent chacun des plastes à double-membrane de structure différente (Delwiche, 1999, 2007). Les Glaucophytes seraient plus anciens. Les algues rouges auraient évolué de manière plus complexe. Les plantes vertes se seraient beaucoup divisées et sont très présentes aujourd'hui, représentées par des algues très communes et par toutes les plantes terrestres (Andersen, 2013). Ces 3 groupes ancestraux sont largement acceptés dans la communauté scientifique mais l'origine polyphylétique ou monophylétique des ou de l'archaeplaste(s) n'est pas prouvée.

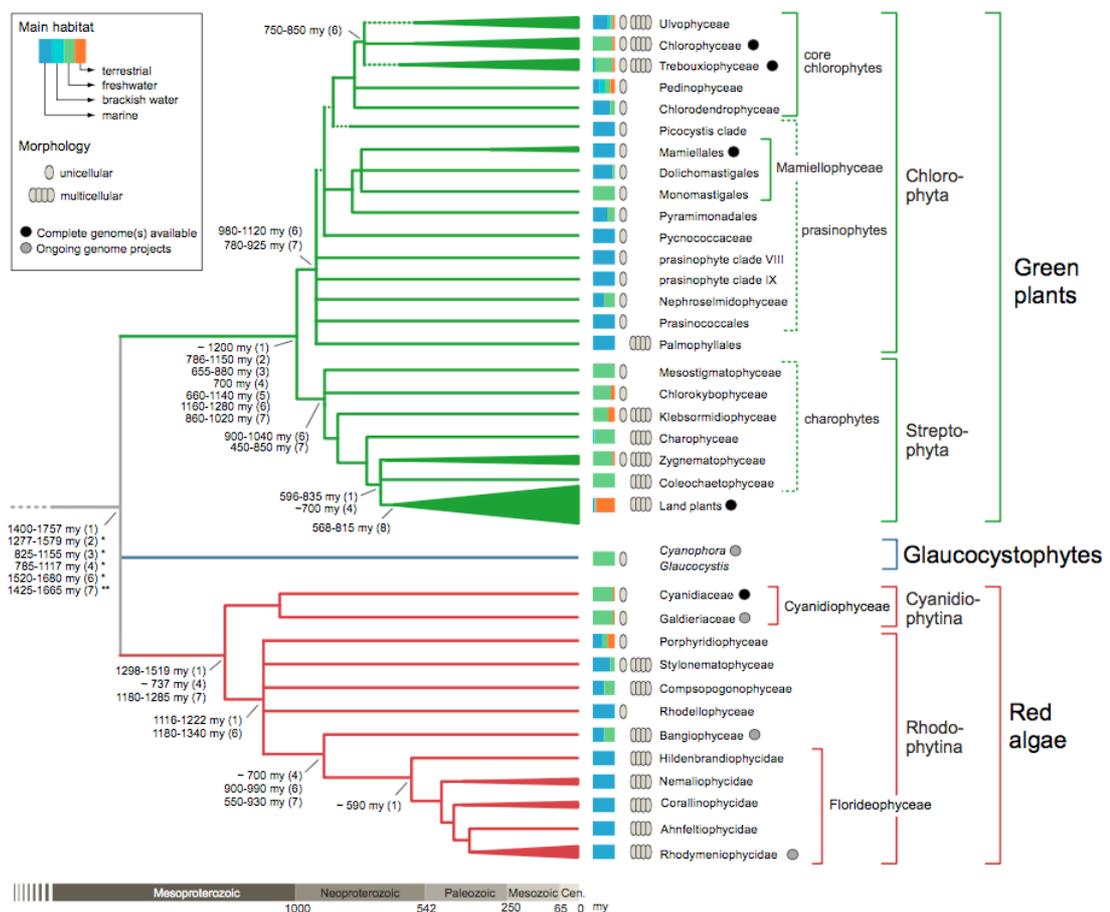


Figure 3 : relation entre les grands groupes d'algues basée sur des données de phellogène moléculaire avec indications sur l'habitat et la morphologie de chaque sous-groupe (De Clerck *et al.*, 2012).

L'événement à l'origine de ces 3 supergroupes serait l'endosymbiose primaire d'une cyanobactérie par une cellule non photosynthétique. L'analyse des génômes des plastes algaux converge en effet vers l'existence d'un plaste ancestral (Keeling, 2010). Au cours du

temps, cette cyanobactérie, alors utilisée par la cellule eucaryote, serait devenu un plaste à part entière dont la division se synchronise avec celle de la cellule hôte. Dans le même temps, la structure et le contenu pigmentaire du plaste auraient évolué diversement d'un groupe à l'autre (De Clerck *et al.*, 2012; Keeling, 2010). Les mécanismes ayant conduit à l'endosymbiose primaire font encore l'objet de débat (Poole and Neumann, 2011; Roger, 1999).

Certains organismes eucaryotes auraient développé la photosynthèse non pas en englobant une cyanobactérie mais une cellule eucaryote photosynthétique. On parle d'endosymbiose secondaire (Hackett *et al.*, 2004). Le plus souvent, c'est une algue rouge qui aurait été « capturée », mais la cellule d'origine pourrait aussi être une algue verte (Andersen, 2013). L'endosymbiose d'une algue rouge aurait eu lieu tôt dans l'évolution. Le groupe issu de ce phénomène est parfois appelé chromalvéolates (Cavalier-Smith, 1999), règne distinct des protistes ou même des algues. Dans ce groupe sont en général regroupés les stramenopiles (heterokont algae, oomycetes, thraustochytrides), alveoltes (Apicomplexa, Ciliés, Dinoflagellés), rhizaria (Amoeabae hétérotrophes, autres groupes autotrophes), cryptophytes et haptophytes (Bodyl *et al.*, 2009; Parfrey *et al.*, 2010). Quant aux groupes des Chloroarachniophytes et des Euglénoides, ils auraient englobé une algue verte (Keeling, 2010).

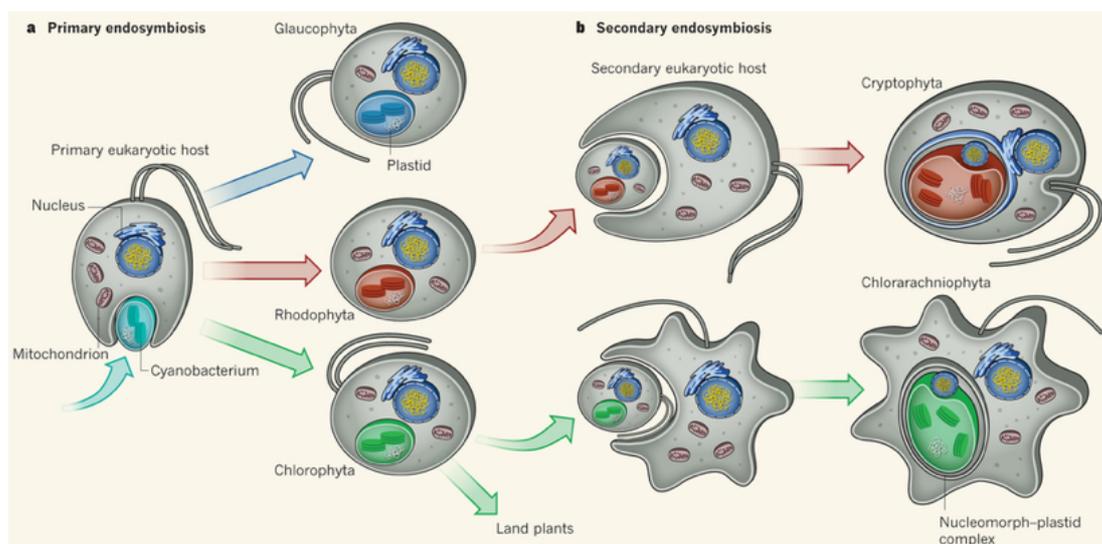


Figure 4 : Scénario d'évolution des algues en trois grands groupes (Glaucophytes, Rhodophytes, Chlorophytes) suite à l'endocytose d'une cyanobactérie. Des endosymbioses secondaires auraient également eu lieu au cours de l'évolution chez les Rhodophytes et Chlorophytes (Gould, 2012).

i. Les glaucophytes

Les glaucophytes (ou Glaucocystophytes) constitueraient le plus ancien groupe d'organismes photosynthétiques eucaryotes. C'est un petit groupe d'algues unicellulaires retrouvées en eaux douces et en environnements terrestres. Ce groupe occupe une place phylogénétique particulière car il est relié à l'endosymbiose d'un archaéoplaste ancestral. Le plaste des glaucophytes est original car il possède des caractéristiques structurales très proches de celles des cyanobactéries : paroi de peptidoglycane de type procaryote autour du plaste, chlorophylle a et phycobiline comme uniques pigments (Andersen, 2013; Steiner and Löffelhardt, 2002)

Seulement 13 espèces ont été décrites dans ce groupe (De Clerck *et al.*, 2012).

ii. Les algues rouges

Les algues rouges est un des grands groupes d'algues eucaryotes. Elles comptent environ 6000 espèces, le plus souvent marines et pluricellulaires, des macroalgues marines. Elles présentent une grande diversité morphologique, biochimique, et écologique, avec notamment des cycles de vie complexes alternant stade haploïde et diploïde (Verbruggen *et al.*, 2010).

Elles ne possèdent pas de chlorophylle. L'énergie lumineuse est captée par des phycobiliprotéines (phycocyanine, allophycocyanine, phycoérythrine). Les photo-antennes permettant de récolter l'énergie lumineuse sont regroupées en complexes protéiques hémisphériques, les phycobilisomes, ancrés aux thylakoïdes. Ils ne sont pas empilés dans le plaste mais répartis isolément dans le stroma du plaste. Autre caractéristique : les algues rouges n'ont jamais de flagelle ou de centriole, quelque soit le stade cellulaire. Cela a des conséquences sur la mitose et les cycles de vie de ces espèces (Brodie and Lewis, 2007; Graham *et al.*, 2009).

Parmi les 6000 espèces d'algues rouges, 5800 appartiennent aux Florideophyceae, dont font partie notamment de nombreuses macroalgues exploitées commercialement (Euchema, Gelidium, Gracilaria) (Andersen, 2013).

iii. Les plantes vertes

Les plantes vertes, ou Viridiplantae, est l'un des principaux groupes d'organismes photosynthétiques eucaryotes. Elles regroupent les algues vertes et les plantes terrestres. C'est un groupe très hétérogène sur les plans biochimique, morphologique et écologique. La monophylie de ce groupe est bien établie, à partir de critères moléculaires, morphologiques et biochimiques (Leliaert *et al.*, 2012; Lewis and McCourt, 2004).

Les plantes vertes possèdent des caractéristiques communes. Leurs chloroplastes sont entourés d'une double membrane, leurs thylakoïdes sont regroupés et empilés et contiennent de la chlorophylle a et b ainsi que des pigments accessoires dont des caroténoïdes et des xanthophylles. Certaines espèces possèdent un pyrénoloïde, enveloppé par le chloroplaste et entouré d'amidon. L'amidon est la principale réserve en polysaccharides. Certaines espèces possèdent des parois, composées généralement de cellulose. La plupart des algues vertes possèdent un flagelle, dans au moins un de leurs stades cellulaires (Graham *et al.*, 2009; Hoek *et al.*, 1995). Notons que nombre d'algues vertes ne possèdent pas de pigments accessoires. Chez elles, les stockages se font essentiellement sous forme d'amidon (Mattox and Stewart K.D., 1984).

Du point de vue morphologique, les plantes vertes présentent une extrême diversité. Elles peuvent être unicellulaires ou pluricellulaires et complexes. Les plantes terrestres comptent plus de 250 000 espèces, bien plus que les algues vertes, pour lesquelles on dénombre environ 15 000 espèces décrites. Pourtant, la diversité cytomorphologique et la diversité biochimique sont beaucoup plus grandes chez les algues vertes. Cela reflète leur âge dans l'échelle de l'évolution (Leliaert *et al.*, 2012).

Les plantes vertes sont retrouvées dans un très grand nombre d'écosystèmes. Elles sont très souvent retrouvées dans des eaux douces (la plupart des charophytes, chlorophyceae, trebouxiophyceae) et dans des environnements marins (ulvophyceae, prasinophytes), mais certains groupes se sont adaptés à des habitats spécifiques (sec, arctique, eaux profondes) (Not *et al.*, 2012).

Les plantes vertes sont apparues il y a 700 à 1500 Ma (Berney and Pawlowski, 2006; Herron *et al.*, 2009). Elles se sont rapidement divisées en 2 grands groupes : Chlorophyta et Streptophyta (Leliaert *et al.*, 2012). Les chlorophyta se sont diversifiées sous forme

unicellulaire au cours du Meso et Neoproterozoïque, et deviennent dominantes dans le phytoplancton des océans du Paléozoïque (542-250 Ma) comme le prouvent les dépôts fossiles des parois résistantes de certaines Prasinophytes (Tappan, 1980). Au cours du Mésozoïque, cette dominance océanique diminue et laisse place à celle des diatomées et des coccolithophores (Falkowski *et al.*, 2004). Ces formes ancestrales évolueront en 2 grands groupes : les prasinophytes et les core Chlorophytes. Leurs espèces sont présentes dans les habitats d'eaux douces, marins et terrestres.

Les Chlorophyta

Les chlorophyta forment un grand groupe d'algues vertes d'une grande diversité morphologique. La grande majorité de ses espèces est regroupée dans 3 classes : Ulvophyceae, Trebouxiophyceae et Chlorophyceae (De Clerck *et al.*, 2012). *Botryococcus Braunii* appartient à la classe des Trebouxiophyceae. Cette classe compte des espèces de morphologies très différentes (flagelle, coccoïdes, colonies, filaments pluricellulaires...), retrouvées principalement sur terre ou en eau douce. Certaines vivent en symbiose avec des champignons, des protistes, des invertébrés, des plantes (Leliaert *et al.*, 2012).

Les Streptophyta

Les Streptophyta sont composés des plantes terrestres et d'algues vertes (charophytes). Elles se sont d'abord diversifiées sous forme unicellulaire en eaux douces (Becker and Marin, 2009). Les premières Streptophyta étaient des Charophytes, qui se sont diversifiées en plusieurs groupes. Il y a environ 450 Ma, certains de ces charophytes ancestraux ont colonisé la terre puis ont évolué en plantes terrestres (Delaux *et al.*, 2012).

I.2 Les microalgues

Les microalgues désignent toutes les algues unicellulaires. Elles peuvent être procaryotes ou eucaryotes, comme *B. braunii*. Elles peuvent vivre isolées ou de manière organisée, en filaments ou en colonies par exemple. Elles sont rencontrées dans presque tous les écosystèmes et par conséquent peuvent synthétiser une exceptionnelle diversité de molécules.

I.2.1 Ultrastructure des algues

L'ultrastructure des algues est très variée, beaucoup plus que chez les animaux et les plantes terrestres. Cela montre leur âge très avancé dans l'évolution et leur grande capacité à s'adapter à leur environnement.

Les cyanobactéries ont des cellules plutôt simples. Les cellules eucaryotes sont beaucoup plus complexes, avec de nombreux organites, qui sont autant de compartiments métaboliques spécialisés (Martin, 2010). Un des organites primordiaux des algues est le chloroplaste. Il contient les pigments qui captent l'énergie lumineuse. Il contient son propre ADN. Les algues vertes peuvent stocker de l'amidon dans le chloroplaste (Ball *et al.*, 2011). Les mitochondries sont aussi indispensables aux algues, comme aux animaux (Shiflett and Johnson, 2010). La structure du noyau et du Golgi des algues sont en général similaires à ceux des plantes et des animaux.

Les algues eucaryotes peuvent contenir des vacuoles. Elles peuvent permettre de maintenir une pression osmotique positive et donc la rigidité de la cellule, alors qu'elles stockent des bioproduits cellulaires (particulièrement en période de stress) pouvant avoir une influence sur l'osmolarité cellulaire (Andersen, 2013).

Les parois et autres enveloppes qui entourent les cellules algales sont des structures polymériques qui représentent une grande partie du carbone fixé par la photosynthèse. Une paroi cellulaire, entourant la totalité du cytoplasme, est souvent présente chez les algues (cyanobactérie ou eucaryote) et lui permet d'augmenter sa pression intracellulaire sans éclater. Cette paroi peut être épaisse et protéger la cellule du milieu extérieur mais permet toujours de conserver un échange osmotique entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Les

cyanobactéries ont souvent une paroi de peptidoglycanes, en couches ou en fibrilles. Cette paroi est source de protéines, comme chez la spiruline. La paroi des macroalgues rouges a une structure en microfibrilles de cellulose imprégnées de polymères de galactanes sulfatés et de mucilages. Les agars et carraghénanes font partie de ces polymères très sulfatés utilisés commercialement comme émulsifiants et épaississants. Chez les algues vertes, les parois sont composées le plus souvent de cellulose, d'hémicellulose, de composés pectiques et de glycoprotéines (Andersen, 2013).

D'autres « couches » peuvent entourer les cellules. Les thèques, souvent de structure cellulosique microfibrillaire, entourent presque toute la cellule chez certaines algues. Les loricas, similaires aux thèques mais plus éloignées de la cellule, sont souvent jaunes ou rouges. D'autres substances polymériques peuvent former une matrice polymérique extracellulaire. Leur composition peut être à base de cellulose, de silice, de carbonate de calcium... Une paroi solide peut être un avantage pour la culture de microalgues car elle permet de conserver l'intégrité cellulaire face aux forces exercées par les pompes et les mécanismes de mélange des cultures. Mais ces cellules sont souvent difficiles à briser et l'étape d'extraction de produits d'intérêt peut devenir très énergivore (Andersen, 2013).

I.2.2 Contenu biochimique des microalgues

Les microalgues sont composées des grandes classes de biomolécules, comme chez les autres organismes vivants, mais dans cette famille, leur diversité est exceptionnelle. De plus, le contenu biochimique des microalgues peut être fortement modifié selon les conditions de croissance de l'organisme (Beer *et al.*, 2009). Il est ainsi possible de manipuler les conditions de culture d'une algue afin d'en modifier le contenu biochimique. L'étude du contrôle des conditions de culture d'une microalgue fait l'objet de la suite de cet exposé.

Les sucres (carbohydrates) sont souvent stockés sous forme d'amidon ou d'un sucre de structure similaire. Des grains d'amidon peuvent être aisément observés au microscope optique à l'intérieur des cellules. Le squelette de base de l'amidon peut être un glucane à liaison α -1,4 ou β -1,3. Leur degré de polymérisation est très variable (Andersen, 2013).

La diversité des protéines d'algues est également très importante. La composition protéique peut être modifiée en changeant les conditions environnementales (Grossman *et al.*, 1995). Les cyanobactéries, avec leur paroi cellulaire en peptidoglycanes, sont très riches en protéines (40 à 60 %MS) par exemple chez *Arthrospira* ou *Synechococcus* (Becker, 2007). Les algues vertes sont également riches en protéines (30 à 60 %MS chez *Euglena* ou *Porphyridium*). Les cellules en croissance active, en phase de division cellulaire sont souvent plus riches en protéines. En phase stationnaire, elles sont plus riches en lipides. Certaines algues ont la capacité de stocker de l'azote sous forme de protéines. Lorsque ce nutriment devient limitant, l'algue peut relarguer l'azote nécessaire à partir des protéines accumulées. Certaines algues accumulent une grande quantité de RuBisCo, enzyme cruciale pour la photosynthèse. Cette accumulation est appelée pyrénolide et peut être très utile à la cellule en cas de déficit en azote dans l'environnement (Kuchitsu *et al.*, 1988).

Les lipides existent chez les algues également sous une grande diversité de structures. Une grande diversité d'acides gras et de stérols existe. Ils sont présents dans les membranes cellulaires et sont donc plus difficiles à extraire que les autres types de lipides qui s'accumulent sous forme d'inclusions. Les galactolipides sont les constituants les plus abondants des membranes des thylakoïdes. Dans les inclusions, sont retrouvés le plus souvent des lipides de réserve. Parmi eux, on compte des acides gras poly-insaturés (AGPI), dont notamment de l'acide arachidonique (oméga-3), de l'acide docosahexaénoïque (DHA), de l'acide eicosapentaénoïque (EPA). Les hydrocarbures (HC) sont rarement retrouvés en forte proportion chez les algues. Seules quelques espèces, dont *Botryococcus braunii*, a la particularité d'accumuler des HC. Cette algue est présentée dans la suite de cet exposé.

Il est à noter que la composition en lipides est très liée aux conditions de culture, en particulier la concentration en azote dans le milieu de culture. En effet, de nombreuses algues vertes accumulent des lipides en conditions de stress, notamment une carence en azote (Guschina and Harwood, 2006).

I.3.1 Classification de *B. braunii*

Botryococcus braunii Kützing, décrite pour la première fois en 1849 par Kützing, est une microalgue verte qui a d'abord été classée dans l'embranchement des Chlorophytes, la classe des Chlorophycées, l'ordre des Chloroccales (Couté, 1987; Plain *et al.*, 1993). Komárek et Marvan (1992) ont décrit 13 espèces dans le genre *Botryococcus*, sur la base d'observations morphologiques d'algues prélevées dans leur environnement naturel : la forme des colonies, leur couleur, la taille des cellules. Or, il a été montré que certains critères morphologiques sont fortement influencés par les conditions de cultures et que la morphologie est clone dépendant (Plain *et al.*, 1993). Pour ces raisons, la classification de Komárek et Marvan (1992) a été très peu utilisée.

La classification de l'espèce ne fait toujours pas l'objet d'un consensus international. Néanmoins, depuis quelques années, les analyses génétiques menées sur plusieurs souches montrent des résultats cohérents. Les souches de *B. braunii* dont l'ARNr 18S a été étudié forment un groupe monophylétique (Kawachi *et al.*, 2012; Senousy *et al.*, 2004; Weiss *et al.*, 2010a), appartenant à la classe des *Trebouxiophyceae*. Le groupe le plus proche phylogénétiquement est le genre *Choricystis*.

Au sein-même de l'espèce, les souches de *B. braunii* sont classées en groupes biochimiques basés sur la nature des HC majoritaires synthétisés par les individus. Ces groupes biochimiques sont usuellement appelés races depuis 1980 (Largeau *et al.*, 1980a). Il existe 3 races (races A, B et L). Plus récemment, Senousy *et al.* (2004) et Weiss *et al.* (2010) ont proposé une corrélation possible entre la phylogénie et la chimie des HC, avec les races B et L plus proches que la race A, les voies de biosynthèse des HC étant plus proches pour les deux premières. Enfin, Kawachi *et al.* (2012), par l'étude de 31 souches, ont proposé l'existence d'une quatrième race (race S).

B. braunii est une espèce coloniale ubiquiste, largement répandue dans les eaux douces et saumâtres (Aaronson *et al.*, 1983; Blackburn, 1936; Couté, 1987; Komárek and Marvan, 1992; Wake and Hillen, 1980), et sous différents climats (tempéré, continental, tropical, alpin). Elle a également été signalée dans des milieux marins ou hypersalins (Bauld, 1981; Masters, 1971). Les races A et B sont les plus souvent retrouvées par Couté (1987). Couté (1987) qui a abondamment prospecté à la recherche de nouvelles souches. Ses prospections l'ont mené dans des régions où sont connus des gisements fossiles (Crescent, Grobois, Lingoult...), des régions au substrat acide (Coat-ar-herno, Vioreau...), voire volcanique, analogues aux gisements fossiles, de régions caractérisées par leur éloignement géographique (Pareloup, Sanguinet...). La prospection a été menée sur d'autres continents, Antilles (La Manzo, Paquemar...), Afrique (Oukaïmden, Ayamé, Kossou, Taabo...), dans les îles de l'océan indien. Il ressort que les souches des régions tempérées semblent être majoritairement de race A, les souches de région chaude ou tropicale de race B (Couté 1987). Toutefois, aucune relation définitive n'a été établie entre la phylogénie des souches, leur race et la localisation des sites de prélèvement (Kawachi *et al.*, 2012).

B. braunii est connue pour donner naissance à des efflorescences massives (Aaronson *et al.*, 1983; Wake and Hillen, 1980, 1981). Les conditions de leur formation ne sont pas connues. Il a été constaté néanmoins qu'elles se forment souvent dans des lacs éphémères ou des réservoirs (Wake and Hillen, 1980). Des lacs, des étangs, des mares, des réservoirs, des tourbières ont ainsi été prospectés. Il s'avère que *B. braunii* affectionne particulièrement les réservoirs artificiels (Couté, 1987). Dans chaque cas, on remarque que cela se produit dans des eaux statiques. Dans une efflorescence, les colonies de *B. braunii* représentent 70 à 90% de la biomasse des échantillons prélevés (Casadevall *et al.*, 1985a). Les colonies peuvent être vertes ou oranges (Couté, 1987). La proportion d'HC dans ces colonies est autour de 30%MS. Un taux de 86 %MS a cependant déjà été mesuré (Maxwell *et al.*, 1968). La coexistence de souches de races A et B a été rapportée à plusieurs reprises (Metzger *et al.*, 1989; Wake et Hillen, 1981), ainsi que celle de races L et B (Metzger *et al.*, 1990).

I.3.3 Morphologie

Komárek et Marvan (1992) distinguent plus de 10 espèces dans le genre *Botryococcus*. La classification de ces auteurs est basée sur l'observation de spécimens du milieu naturel (Kawachi *et al.*, 2012). Or, la morphologie varie pour une même souche et des conditions données avec l'âge, l'état physiologique et les conditions de culture/environnementales (Plain *et al.*, 1993). Pour certains algologues, beaucoup d'algues du genre *Botryococcus* sont donc classées à tort dans le morphotype *B. braunii* (Metzger *et al.*, 1997).

Cellules

Classiquement, les cellules mesurent 9-15 μm de longueur et 5 à 8 μm de largeur (Plain *et al.*, 1993), alors que les souches de race L ont des cellules plus petites (8-9 μm x 5 μm), ce qui a mené certains auteurs à regrouper ces souches sous l'espèce *Botryococcus neglectus* (Metzger *et al.*, 1997).

Le noyau cellulaire est central. Les cellules contiennent des inclusions lipidiques. Le chloroplaste est unique. Il possède plusieurs lobes plaqués contre la paroi latérale et est muni d'un pyrénôïde localisé dans la région basale (Berkaloff *et al.*, 1984). La race L a un pyrénôïde moins visible (Metzger *et al.*, 1990) (Figure 5).

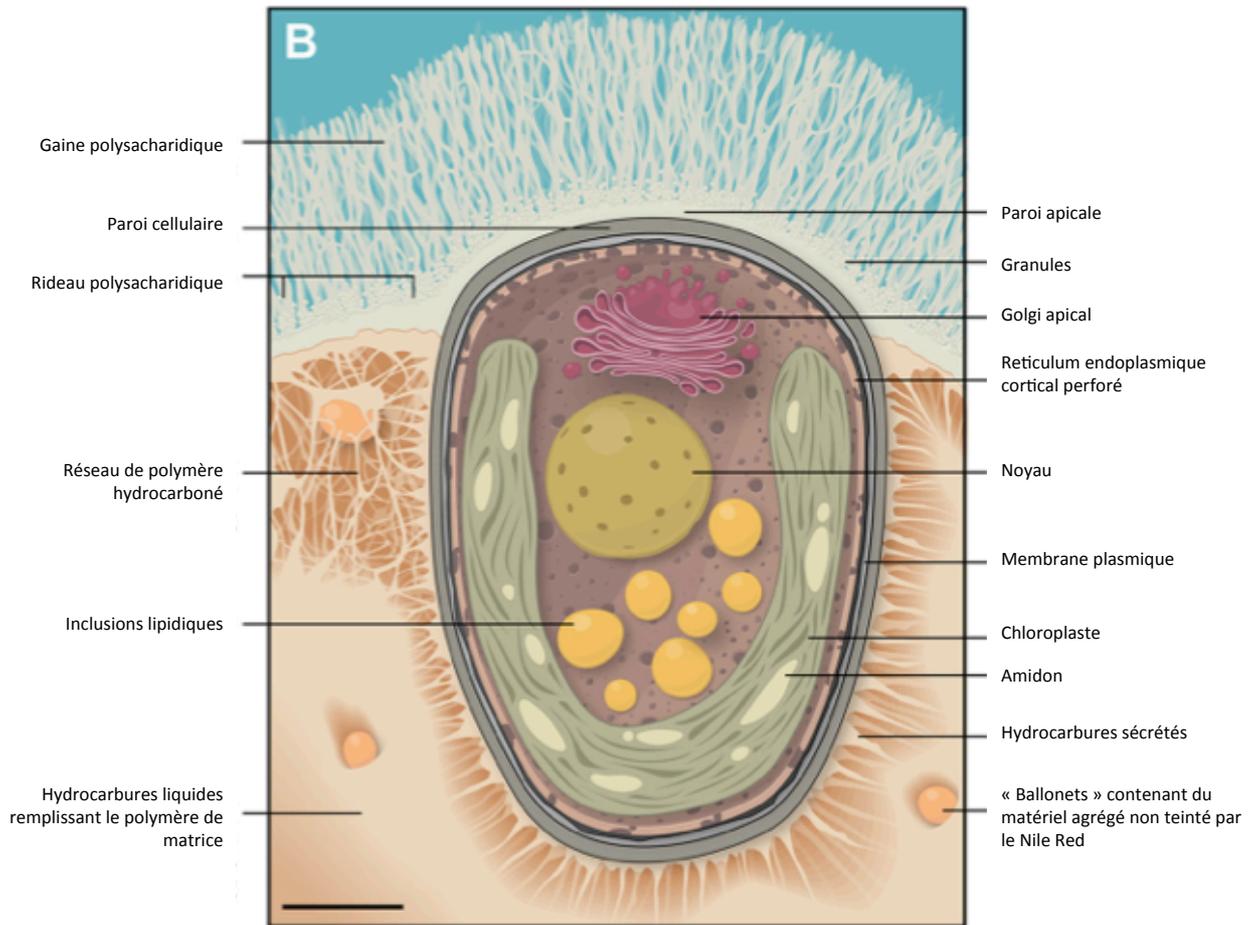


Figure 5 : structure cellulaire d'une cellule de *B. braunii*, d'après l'analyse d'une souche de race B (Weiss *et al.*, 2012).

Colonies et matrice polymérique

B. braunii possède un caractère morphologique particulier de par son ultrastructure. Grâce à une matrice polymérique, les cellules sont réunies sous forme de colonies et l'algue retient comme une éponge des quantités parfois considérables de lipides, majoritairement des HC (Largeau *et al.*, 1980a). Lorsqu'on presse une colonie gorgée d'huile, on peut voir en microscopie optique des gouttelettes d'huiles s'en échapper (Figure 6) (Weiss *et al.*, 2010b). L'étude en spectroscopie Raman a montré qu'il s'agissait pratiquement d'HC à l'état pur (Largeau *et al.*, 1980a). Une partie d'entre eux sont transformés, hors des cellules, pour être intégrés au polymère de la matrice (Metzger and Largeau, 1999).

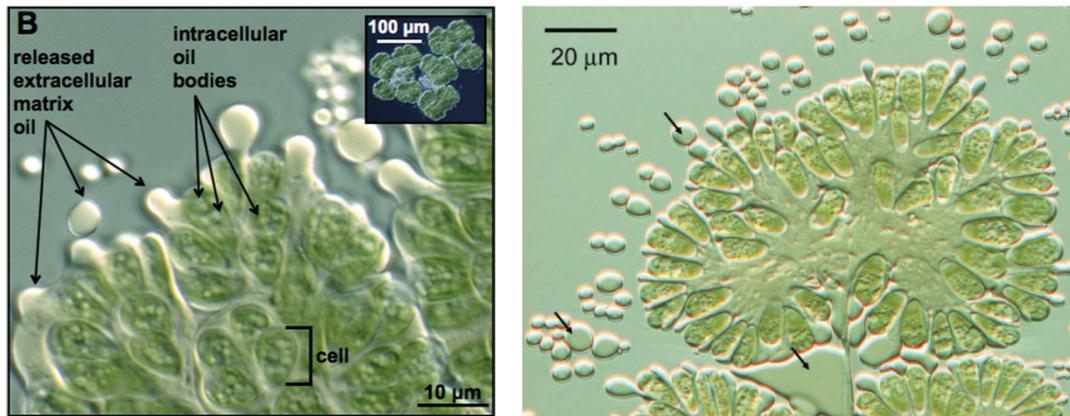


Figure 6 : vues partielles en microscopie optique de deux colonies de *B. braunii*. Visualisation de l'expulsion des gouttelettes d'huiles de la matrice après une légère pression sur la lamelle (à gauche, Weiss *et al.*, 2010b; à droite, Watanabe and Tanabe, 2013)

Les colonies sont classiquement décrites comme ayant un aspect de grappe de raisin (Plain *et al.*, 1993). Elles peuvent être petites ($< 25\mu\text{m}$) avec 1 à 4 cellules (Shimamura *et al.*, 2012) et très grandes ($> 1\text{ mm}$) (Tanabe *et al.*, 2012).

La matrice est en fait formée de couches successives de paroi saturées d'huile (Figure 7) (Largeau *et al.*, 1980a). Les races B et L ont une matrice plus dense (Metzger *et al.*, 1997). Les cellules sont en général regroupées par deux, entourées d'au moins deux gaines, la plus externe entourant les deux cellules. A chaque nouvelle division, la cellule fille sécrète une nouvelle paroi et reste également entourée de la paroi de la cellule-mère (Figure 8) (Blackburn, 1936). Lorsque la culture avance en âge, les cellules sont souvent associées par quatre et s'enfoncent dans la matrice. Des boursouflures correspondant aux globules d'HC extracellulaires sont alors visibles en surface des colonies (Plain *et al.*, 1993), sauf chez la race L (Metzger *et al.*, 1990). Le nombre de gaines autour des cellules augmente avec le temps dans les cultures et dépasse rarement cinq dans des conditions standard. L'épaisseur des gaines va de paire avec la teneur en HC et reflète leur accumulation progressive entre les gaines (Plain *et al.*, 1993). Les couches de paroi successives sont des couches trilaminaires (TriLaminar Sheath ou TLS) d'algaenan et sont partiellement fusionnées (Schnepf and Koch, 1978).

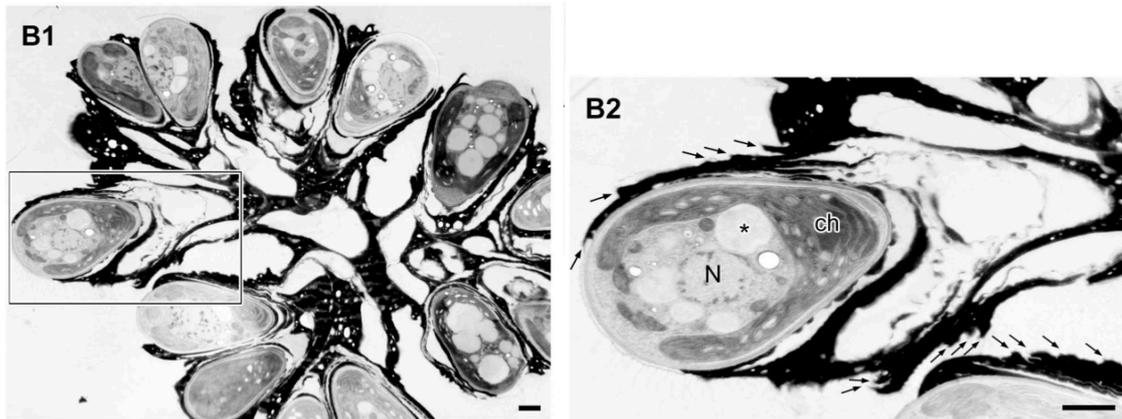


Figure 7 : Image par microscopie électronique d'une colonie de *B. braunii* (à gauche) et zoom sur une cellule et les couches de polymères de matrice qui l'entourent, désignées par des flèches (Suzuki *et al.*, 2013).

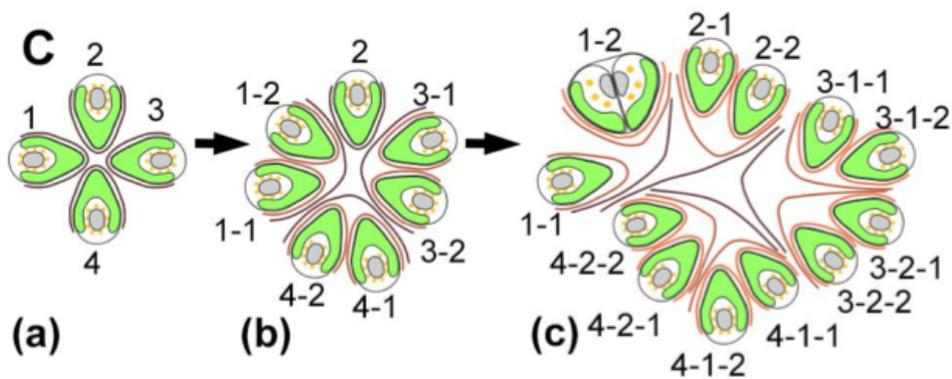


Figure 8 : Evolution supposée de l'organisation d'une colonie. Les divisions successives des cellules regroupent les cellules deux par deux et ajoutent une couche de polymère à la base de chaque cellule (Suzuki *et al.*, 2013).

Réseau fibreux périphérique

Les colonies sont entourées d'une couche d'un réseau fibreux de polysaccharides extracellulaires, réparti de manière relativement homogène autour des colonies. L'épaisseur de cette couche polysaccharidique est plus épaisse au niveau apical des cellules (Largeau *et al.*, 1980a; Plain *et al.*, 1993). Ce réseau (nature des ornements, épaisseur, structure interne) rappelle les ornements pariétaux décrits chez des espèces de microalgues issues du genre *Scenedesmus* (Plain *et al.*, 1993).

De nombreuses microalgues vertes peuvent accumuler de grandes quantités de dérivés d'acides gras, principalement des TAG, lorsque la division cellulaire est inhibée, à cause de l'épuisement d'un nutriment, en particulier l'azote. Cette accumulation reflète un changement de voie métabolique. Lorsque les voies qui mènent à la division cellulaire sont réduites, la cellule oriente son métabolisme vers le stockage d'énergie comme les TAG. L'accumulation des HC chez *B. braunii* ne suit manifestement pas ce processus. Alors que les acides gras et leurs dérivés estérifiés (TAG en particulier) s'accumulent en phase stationnaire avec en général une faible productivité, les HC sont produits à tous les stades physiologiques (Casadevall *et al.*, 1985a). Ils ne sont donc pas synthétisés lorsqu'une autre voie de biosynthèse est fortement inhibée. La synthèse d'HC semble être un caractère constitutif du métabolisme de l'espèce dans des cellules saines. La littérature rapporte ainsi que la productivité en HC est maximale en phase exponentielle de croissance, et le taux maximal dans la biomasse est atteint en fin de phase exponentielle avant de diminuer lentement, probablement pour la synthèse du polymère de matrice (Metzger *et al.*, 1985a).

L'étude des HC de *B. braunii* montre qu'ils sont peu abondants à l'intérieur de la cellule avec moins de 1 %MS (Largeau *et al.*, 1980a). Ce taux est similaire à celui mesuré dans d'autres algues vertes unicellulaires. La quantité de lipides qu'elle fabrique, principalement des HC, est principalement excrétée dans la matrice. En effet, 95 % des HC sont situés dans la matrice (Figure 9). Un faible pourcentage est aussi parfois retrouvé dans le milieu de culture, en quantité inférieure au pool intracellulaire (Largeau *et al.*, 1980a). La matrice assure la cohésion des cellules pour former les colonies et se comporte comme une éponge vis-à-vis des lipides exsudés. En effet, il a été observé que les algues de *B. braunii* peuvent augmenter fortement leur volume lorsqu'ils sont immergés dans une huile ou un solvant de faible polarité (Metzger and Largeau, 1999). Hors des cellules, les lipides « simples » sont polymérisés (polyacétals, polyéthers), et les terpènes (dont des caroténoïdes) et les phénols ou autres cycles oxygénés peuvent jouer leur rôle de protection antioxydante et antimicrobienne. Ainsi, en phase stationnaire de croissance, alors que les colonies ont formé une matrice conséquente qui emprisonne une quantité importante d'huile, elles peuvent se mettre à flotter à la surface de l'eau. Là, les cellules sont exposées à de fortes intensités lumineuses et profitent de l'effet protecteur des lipides accumulés. Notons que ces capacités de protection peuvent être reliées à la grande résistance de *B. braunii* à des conditions de stress importantes

et longues : anaérobie, illumination continue, obscurité prolongée. Dans ces conditions, la croissance de l'algue est très lente, comparée à la croissance en systèmes de culture ou même en conditions standard (sans bullage d'air enrichi en CO₂) (Belcher, 1968; Casadevall *et al.*, 1985b; Chu, 1942). Ce comportement peut finalement être comparé à celui d'une spore, très résistante à des conditions hostiles extrêmes, avec une protection due à un polymère résistant de structure proche des algaenans (sporopollénine).

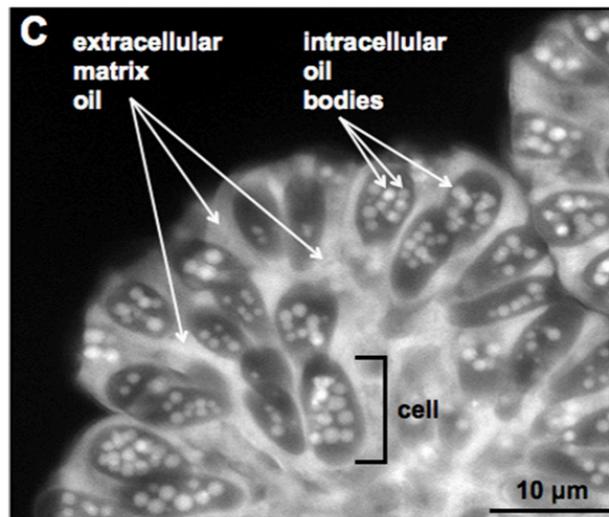


Figure 9 : vues partielles en microscopie optique d'une colonie de *B. braunii*. Visualisation par fluorescence, après marquage au Nile Red, des inclusions lipidiques intracellulaires et des lipides extracellulaires (d'après Weiss *et al.*, 2010b).

Chapitre II Lipides à potentiel pharmaceutique de la microalgue *B.* *braunii*

Les organismes vivants sont une source potentielle, et en grande partie inexplorée, de composés bioactifs ou pouvant déboucher sur une utilisation dans le domaine pharmaceutique. Nombre d'entre eux sont déjà utilisés pour des applications dans ce domaine. *B. braunii* synthétise des lipides classiques mais aussi des lipides très originaux. Le métabolisme d'une cellule sait produire naturellement presque exclusivement des lipides insaturés et contenant en partie des hétéroatomes (atomes autres que carbone, hydrogène ou métal). Autrement dit, les HC directement issus de la biomasse sont rares dans l'environnement. C'est justement ce type de biomolécules qui font l'originalité biochimique de *B. braunii* et l'espèce est capable de les synthétiser mais aussi de les accumuler.

II.1 Les lipides d'origine naturelle

a Définitions des lipides

La définition des lipides que nous utiliserons est très large puisqu'elle représente toutes les molécules non solubles dans l'eau. Ce caractère lipophile provient de leurs chaînes hydrocarbonées. Les groupements fonctionnels, oxygénés, phosphorés ou azotés, intégrés dans certains lipides augmentent leur polarité. De manière schématique, pour une molécule fonctionnalisée, plus le squelette hydrocarboné est grand plus la molécule sera apolaire et donc soluble dans les solvants organiques les plus apolaires (hexane, benzène, éther éthylique, chloroforme...).

La classification des lipides la plus communément employée consiste à les classer selon leur solubilité. Les lipides sont donc, d'après cette définition, des molécules pas (ou très peu) solubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques. Dans un extrait biologique, ce sont classiquement les molécules récupérées par le mélange de solvant chloroforme/méthanol 2:1 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 2:1). Dans sa récente « introduction à la lipidomique » Leray (2010) classe

les lipides en fonction de leur structure : lipides simples (à un et deux composés), lipides complexes (à au moins trois composés). Sud *et al.* (2012) utilisent une classification basée plutôt sur l'origine biosynthétique des molécules, qui inclue la famille des polykétides. Ces définitions sont très larges et englobent une très grande diversité de molécules. D'autres auteurs définissent les lipides comme étant uniquement les acides gras et leurs dérivés (Christie, 2013).

a Lipides neutres

Nous considérerons, schématiquement, les lipides neutres comme équivalents aux lipides simples, c'est-à-dire comme des lipides à un et deux composés (Leray 2010). Ils sont composés de un à deux constituants, dont au moins un appartenant à la classe des lipides. Les êtres vivants utilisent principalement deux voies pour synthétiser les chaînes hydrophobes qui donnent leurs propriétés aux lipides neutres (Fahy *et al.*, 2005). La voie des acides gras produit des chaînes hydrocarbonées linéaires à partir de malonyl-CoA. La voie des terpènes produit des chaînes hydrocarbonées ramifiées à partir des deux isomères de l'isoprène. D'autres lipides sont produits par transformation de certains acides aminés. Lorsque la molécule possède un deuxième constituant, celui-ci peut être un glucide ou un acide aminé.

i. Dérivés d'acides gras

Un acide gras est une chaîne carbonée avec une fonction acide carboxylique. Sa synthèse biologique peut dériver de différentes voies. Dans ce paragraphe, nous parlerons des acides gras linéaires, parfois appelés acides gras « normaux » (Leray, 2010), c'est-à-dire sans ramification. Certains auteurs les considèrent, avec leurs dérivés, comme la définition-même des lipides (Christie, 2013). Ils sont synthétisés par condensation d'unités malonyl-CoA, elles-mêmes dérivées de l'acétyl-CoA par un complexe acide gras synthase. Ils contiennent le plus souvent un nombre pair de carbones formant une chaîne linéaire qui peut être saturée ou insaturée. Des acides gras pairs de C₂ à plus de C₃₀ ont déjà été identifiés (Christie, 2013).

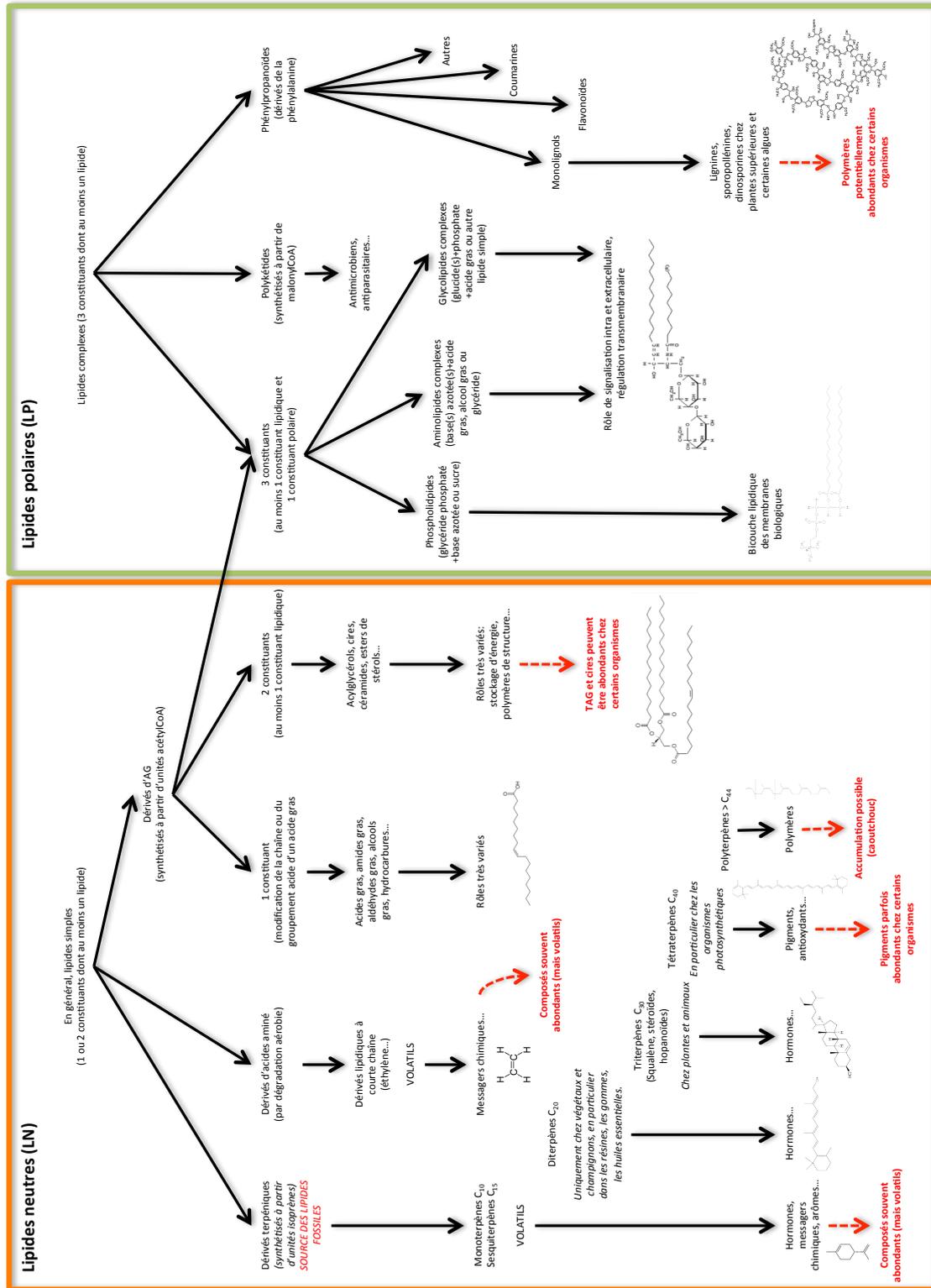


Figure 10 : Classification des lipides suivant leur structure et leur polarité. Illustration avec quelques exemples de structures. En rouge, les groupes de lipides ayant un fort potentiel pour une utilisation comme biocarburant, soit du fait de leur structure soit de leur abondance dans le milieu naturel.

Les acides gras se retrouvent dans les cellules sous formes dérivées. Les dérivés à un seul constituant sont des acides gras dont la chaîne carbonée a été modifiée (greffage d'un groupement chimique, insertion, cyclisation) ou dont la fonction acide a été modifiée ou remplacée. Les dérivés simples à deux constituants sont composés d'un acide gras ou un de ses dérivés à un constituant, combiné à une molécule lipidique simple (dérivé d'acide gras ou stérol) ou non lipidique (glycérol, glucides, acides aminés notamment).

La pharmacopée décrit des principes actifs lipidiques, essentiellement dérivés d'acides gras. La définition des lipides est d'ailleurs restreinte dans la pharmacopée aux acides et alcools gras et à leurs dérivés estérifiés, et aux stérides (stérols et phytostérols) (Bruneton, 2009). Ils sont parfois désignés comme les « huiles fixes », c'est-à-dire les huiles non volatiles. Ces lipides sont utilisés pour des usages pharmaceutiques, alimentaires et industriels (biocarburants sous formes d'esters méthyliques d'AG).

Certaines huiles sont inscrites à la pharmacopée 7^{ème} édition : amande, arachide, carthame, lin, olives, sésames... Leur intérêt réside dans leur richesse en acides gras insaturés (AGI) et/ou dans leurs propriétés antioxydantes. Ce sont des mélanges moléculaires complexes. Ces huiles peuvent contenir des composés actifs non lipidiques (ricine, sésamol...).

Les huiles de Flacourtiacées sont dites « antilépreuses ». Elles sont actives contre les bactéries acidorésistantes (lèpre, tuberculose).

*Les huiles de lin et de pavot oeillette sont riches en acides gras polyinsaturés (AGPI). La première pour ses propriétés siccatives, pour soigner certaines dermatoses. La seconde, extraite du pavot oeillette *Papaver somniferum var. nigrum*, contient des esters éthyliques d'acides gras iodés entrant dans la composition de Lipiodol®. Cette spécialité est utilisée comme produit de contraste iodé (radioopaque) (vidal). Cette huile est, historiquement, le premier produit de contraste qui ait été utilisé, au début du XX^{ème} siècle.*

*Les lipides des plantes supérieures sont aussi utilisés comme **excipients**. Huile d'arachide et d'olive comme excipient huileux. Beurre de cacao et coprah du cocotier comme excipient solide pour suppositoires. Les lécithines de soja sont utilisées comme émulsifiants. Les huiles de soja et de coton sont utilisées en émulsion pour préparations parentérales. Dans ce cadre, les huiles ont l'avantage de présenter un apport calorique important (1g = 9kcal) et d'être vecteur des vitamines liposolubles A, D, E, K (Bruneton, 2009).*

*Les huiles végétales sont aussi utilisées en **dermopharmacie** et cosmétique. Des huiles de noyaux (pêche, cerise), d'amande douce, de noisette.*

Du point de vue **nutritionnel**, les **acides gras essentiels** (AGE) sont très recherchés car ils ne peuvent pas, par définition, être produits par notre organisme. Une source nutritionnelle est indispensable pour assurer nos apports quotidiens. Les AGE sont des AGPI, de 2Δ à 6Δ. Parmi eux, l'acide α-linolénique ou ALA et l'acide γ-linolénique ou LA sont à chaîne courte (18C). On compte également des AG ω3 : l'acide eicosapentaénoïque (20:5) et l'acide docosahexaénoïque (22:6), respectivement EPA et DHA. Et des AG ω6 : l'acide gamma-linoléique ou GLA (18:3), l'acide dihomogamma-linoléique ou DGLA (20:3) et l'acide arachidonique ou AA (20:4). Ces AGE sont retrouvés dans les huiles de colza, soja, noix (LA), onagre, bourrache (GLA), et dans certains poissons gras.

Les huiles de ricin et de lin sont utilisées pour extraire l'**acide ricinolénique**. Cet acide est transformé en acide undécylénique par pyrolyse. Celui-ci est exploité sous forme de sels de Zn et de Ca dans le Mycodecyl® comme **fongistatique** (dermatophytoses). Il peut également être transformé en nonalactone, utilisé en **parfumerie**, et en polyamide, utilisé comme **plastifiant** (Vercauteren, 2011).

ii. Dérivés terpéniques (isoprénoides, terpénoïdes)

Les dérivés terpéniques sont représentés par toutes les composés synthétisés à partir d'unités isoprènes (C₅). Dans le milieu naturel, ils proviennent principalement des plantes, mais leur distribution chez les êtres vivants est très large. Ils sont en général présents en faible quantité dans les organismes mais jouent un rôle crucial dans leur physiologie ou la communication entre organismes. Les terpènes sont les lipides simples les plus anciennement apparus sur la terre et se sont accumulés au cours des âges dans les sédiments, participant à la formation des réserves énergétiques fossiles (Leray, 2010).

Deux voies de biosynthèse totalement différentes aboutissent à l'isoprène : la voie du mévalonate (MVA) utilisant l'acétylCoA comme point de départ (tout comme la biosynthèse des acides gras), la voie méthylérythritol phosphate (MEP) utilisant des dérivés de glucides (acétate, glucose...) comme point de départ. Ces deux voies sont assez distinctement distribuées chez les êtres vivants. La voie du MVA est présente chez les animaux, les champignons, un certain nombre de bactéries, dans le cytoplasme des végétaux et de la plupart des algues connues. La voie du MEP est présente chez la plupart des bactéries (Vandecasteele, 2005).

Les dérivés terpéniques dérivent donc, par assemblage d'unités isoprènes, d'un squelette à 10 (monoterpène), 15 (hémiterpène), 20 (diterpène), 30 (triterpène) ou 40 carbones (caroténoïde), celui-ci pouvant subir des pertes de carbones, des réarrangements de structure, des additions d'autres groupes chimiques plus ou moins complexes. Leur origine isoprénique est parfois loin d'être évidente à mettre en évidence (Leray, 2010). En pharmacognosie, historiquement, on les retrouve dans la fraction des insaponifiables .

Les monoterpènes (C_{10}) sont les composés volatils et odorants des végétaux. L'industrie de la parfumerie en synthétise un grand nombre. Ils sont linéaires ou cycliques, et comportent le plus souvent une fonction alcool ou aldéhyde. Les sesquiterpènes (C_{15}) jouent souvent le rôle d'arôme chez les plantes, d'hormone chez les plantes et les animaux, de messenger chimique entre espèces (relations hôte-parasite par exemple). Ils peuvent être linéaires, mono ou multicycliques. Les diterpènes (C_{20}) sont présents uniquement chez les végétaux et les champignons, concentrés dans les résines des conifères, les gommés et les huiles essentielles. Ils jouent le plus souvent un rôle de protection et d'hormone. Ils sont rarement linéaires. Les triterpènes (C_{30}) sont formés à partir d'un précurseur unique, le squalène. Ce dernier est présent dans les huiles végétales et animales et dans les lipides cutanés, et est un des seuls terpènes de ce groupe à avoir une structure linéaire. Les autres terpènes de ce groupe sont formés par cyclisation, oxydation et hydroxylation pour former les stéroïdes et les hopanoïdes. Les tétraterpènes ou caroténoïdes (C_{40}) sont produits par la plupart des organismes photosynthétiques et certains champignons. Lorsque leur nombre de double liaisons conjuguées est suffisant, la molécule est colorée. Ces doubles liaisons leur confèrent des propriétés antioxydantes. Ils jouent aussi un rôle fondamental dans la photosynthèse. Plusieurs d'entre eux sont utilisés comme additifs dans l'alimentation humaine et animale. Les polyterpènes (à plus de 44 carbones) ont des chaînes plus longues et sont organisés parfois en polymère (caoutchouc).

Les drogues à huiles essentielles (monoterpènes et sesquiterpènes)

Les drogues à huiles essentielles sont composées de terpènes à chaîne courte (monoterpènes et sesquiterpènes). Ceux-ci sont reconnues pour avoir différentes propriétés pharmacologiques : antiseptique, expectorant, diurétique, spasmolytiques, sédatives... Ces drogues sont utilisées en pharmacologie, en cosmétique, en parfumerie et dans l'industrie

alimentaire (Bruneton, 2009). Les huiles essentielles sont utilisées pures ou vectorisées (dans une crème, dans du miel, dans un sucre...).

Citons quelques exemples. Le camphre est antiseptique et décongestionnant, il entre dans la composition de pommades (Activox®), de suppositoires (Biquinol®), de solutions pour pulvérisation nasale (Euvanol®). Les terpènes du fenouil, du persil, de l'anis vert, du cumin, de la lavande, du basilic, de la menthe et de nombreuses autres plantes sont également exploitées commercialement pour leurs propriétés pharmacologiques. L'acide shikimique est la principale source de l'oseltamivir (Tamiflu®), traitement antiviral de la grippe, et est extrait du fruit de la badiane de Chine mais cette source n'est pas suffisante pour la production mondiale de ce médicament. C'est pourquoi de nouveaux procédés de production ont été développés, notamment basés sur le génie génétique (Vercauteren, 2011).

Chez certains conifères, les huiles essentielles peuvent être extraites des résines de la plante, dites « oléo-résines ». De la résine de pin maritime est extraite par exemple l'essence de térébenthine. Celle-ci contient notamment du limonène, de l' α -pinène, terpènes utilisés pour leurs propriétés expectorantes (Bruneton, 2009).

Les dérivés lactones sesquiterpéniques sont également connus pour leurs propriétés pharmacologiques et toxiques. L'activité tonique digestif de la gentiane jaune provient de ces composés. L'artémisinine est une lactone sesquiterpénique extraite de l'armoise annuelle, utilisée traditionnellement en Chine comme traitement curatif du paludisme. Aujourd'hui, dans la même indication et aussi contre d'autres parasites, son dérivé, l'Arthéméter, moins toxique, est utilisé en association dans Riamet®. L'Arnica contient également des lactones sesquiterpéniques et est utilisée dans le traitement des échymoses, sous forme de pommade ou de gel (Vercauteren, 2011).

Les drogues à diterpènes

Les diterpènes sont retrouvées dans de nombreuses plantes supérieures. Dans ce groupe de terpènes, on retrouve en particulier les taxanes, composés à propriétés anticancéreuses. Le taxol (Paclitaxel®) est un diterpène tricyclique à noyau taxane extrait de l'écorce de tronc des Ifs. Le taxotère (Docétaxel®) est extrait des feuilles de *Taxus baccata*. D'autres plantes, notamment des Euphorbes, contiennent des diterpènes toxiques.

Triterpènes, stéroïdes, caroténoïdes

« La » vitamine E est formée par un complexe de 8 molécules : des stérols, des carotènes et des tocophérols. Dans la pharmacopée, la vitamine E est utilisée pour traiter l'insuffisance lutéale (menace d'avortement ou d'accouchement prématuré). Elle est utilisée également comme conservateur grâce à ses propriétés antioxydantes. Les fractions insaponifiables de certaines plantes sont plus riches en tocophérols : soja, germe de blé, avocat, fruit du palmier de Floride (à l'origine du Permixon®) (Vercauteren, 2011).

La plus grande partie des hormones stéroïdiennes produites par l'industrie pharmaceutique sont maintenant obtenues par hémisynthèse à partir de substances naturelles : saponosides, phytostérols, cholestérol ou acides biliaires. Les stéroïdes végétaux sont de plus en plus étudiés dans le domaine biologique en raison de leur diversité structurale, de leurs activités biologiques (anticholestérolémique, anti-tumorale, antidiabétique ou anti-inflammatoire) et de leur faible toxicité.

Le squalène est un lipide biocompatible, utilisé depuis de nombreuses années, notamment en cosmétique ou comme adjuvant de vaccins, et est de plus en plus étudié pour des applications en nanomédecine. Le squalène n'est pas un adjuvant en lui-même mais les émulsions de squalène avec des surfactants renforcent la réponse immunitaire. Il est par exemple utilisé dans plusieurs vaccins expérimentaux, notamment le vaccin contre la grippe pandémique et le vaccin contre le paludisme, en cours de développement. Enfin, le squalane, dérivé hydrogéné du squalène, est plus souvent utilisé en cosmétique car il ne s'oxyde pas. Le squalène est également exploité en nanomédecine. Il permet de vectoriser des principes actifs à travers l'organisme. On parle de technologie de squalenoylation. Son association à des molécules antivirales ou anticancéreuses fait l'objet de nombreuses études. L'association squalène-gemcitabine (la fameuse « SQ-gem nanoparticule »), a permis obtenir une efficacité anticancéreuse supérieure comparée à la molécule anticancéreuse seule. Elle empêche notamment la dégradation de la gemcitabine dans le plasma humain et améliore son absorption aussi bien par voie orale que par voie intraveineuse. L'intérêt du squalène dans cette technologie provient en particulier de la capacité du complexe moléculaire amphotère à former des nanoparticules (Saha et al., 2015). Actuellement, les sources industrielles de squalène sont certaines huiles végétales (insaponifiables de l'huile d'olives) ou animales (huile de foie de requin).

iii. Dérivés d'acides aminés

Des alcanes et alcènes non isopréniques à courte chaîne peuvent être produits naturellement par certains organismes vivants, souvent par dégradation aérobie d'acides aminés. L'éthylène en est un des représentant les plus abondants. C'est une hormone très importante chez les plantes. Trois voies de biosynthèse de l'éthylène sont connues jusqu'à présent. Elles utilisent toutes un acide aminé comme précurseur (Ladygina *et al.*, 2006). D'autres hydrocarbures volatils non isopréniques sont retrouvés en quantité non négligeable dans l'atmosphère.

b Lipides polaires

i. Lipides complexes (au moins trois constituants)

Les lipides complexes sont constitués d'au moins trois composants chimiques différents (lipides simples et groupes polaires). Ils sont tous plus polaires que les lipides dits simples (Leray, 2010).

Ils peuvent être divisés en trois groupes :

- Les **phospholipides** sont présents chez toutes les formes vivantes. Ils associent un diacylglycérol phosphaté ou un céramide phosphaté avec une base azotée ou un sucre. Ils permettent de former une structure en bicouche formant les membranes cellulaires, et intégrant d'autres lipides (stérois, glycolipides) et des protéines. Chez les microorganismes, une grande part des acides gras entre dans la composition des membranes sous forme de phospholipides (Vandecasteele, 2005).
- Les **aminolipides** complexes sont présents chez les bactéries et les plantes. Ils associent trois constituants avec au moins une base azotée combinée à des acides gras, des alcools gras ou du glycérol. Ils ne sont pas phosphorylés.
- Les **glycolipides** complexes, le plus souvent présents à la surface des cellules, sont retrouvés chez toutes les formes vivantes. Ils associent au moins trois constituants dont au moins un est un glucide. Ils sont parfois phosphorylés. Ce sont le plus souvent des dérivés glycosylés d'acylglycérols, de céramides ou de lipides prénylés. Ils participent notamment aux mécanismes de signalisation intercellulaire et de régulation des signaux transmembranaires. Ils sont ainsi impliqués dans l'initiation de la

mitogénèse, de la morphogénèse et dans les mécanismes de reconnaissance cellulaire à la base de tout le système immunitaire.

ii. Polykétides

Les polykétides sont synthétisés par polymérisation d'unités malonyl-CoA par différents complexes enzymatiques, de manière similaire aux acides gras. Ils forment un grand nombre de métabolites secondaires des animaux, des plantes, des champignons, des bactéries. Ils possèdent une très grande diversité de structures. De nombreux polykétides sont formés d'un squelette hydrocarboné, substitué par glycosylation, méthylation, hydroxylation, oxydation et/ou d'autres groupements. Beaucoup d'entre eux sont utilisés en pharmacie comme agents antimicrobiens, antiparasitaires, anticancéreux (Dennis, 2010).

Les polykétides sont classés en trois classes en fonction de leur structure (Fahy *et al.*, 2005) :

- polykétides de classe I (ou macrolides) qui sont des lactones de 14 à 40 atomes.
- polykétides de classes II et III qui ont une base cyclique aromatique complexe.

Les polykétides sont à l'origine de plusieurs médicaments « block-busters », parmi lesquels des antibactériens, des antihyperlipidémiants, des anti-cancéreux, des immunosuppresseurs, des antihelminthiques (Staunton and Weissman, 2001).

- *Trois inhibiteurs de la HMG-CoA réductase sont issus de polykétides : simvastatine, pravastatine, lovastatine.*
- *Deux antibiotiques : azithromycine, clarithromycine.*
- *Un immunosuppresseur : sirolimus*

*Certains polykétides d'origine marine ont une activité antiproliférative et sont de potentiels candidats anticancéreux (Carletti *et al.*, 2012).*

Les polykétides sont actuellement produits en manipulant les propriétés de la polykétide synthase (PKS) par génie génétique (Staunton and Weissman, 2001).

iii. Phénylpropanoïdes

Les phénylpropanoïdes sont des lipides phénoliques non isopréniques (Hahlbrock and Scheel, 1989; Leray, 2010). Ils sont formés à partir de l'acide cinnamique, lui-même dérivé de la phénylalanine, acide aminé aromatique. Son dérivé principal est l'acide coumarique. Celui-ci peut dériver en monolignols, en flavonoïdes, en coumarines et en d'autres phénylpropanoïdes (Figure 11). D'autres alcools phénoliques peuvent dériver en monolignols ; l'alcool sinapylique, l'alcool coniphérylique et l'eugénol en sont des exemples abondants. Les phénylpropanoïdes ont principalement des rôles de protection contre les ultraviolets, de molécule signal, de défense (Leray, 2010).

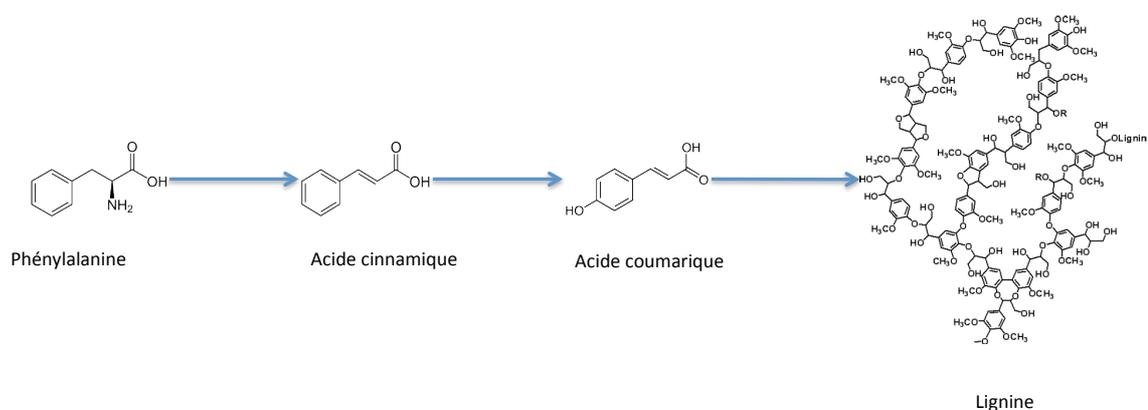


Figure 11 : précurseurs principaux de la lignine, polymère qui représente un très grand réservoir de carbone organique.

Les monolignols sont des composés particulièrement intéressants car ils forment la base de la biomasse lignocellulosique (à la base des biocarburants de 2^{ème} génération), avec la cellulose et l'hémicellulose. Après polymérisation, ils forment les lignines, les sporopollénines et les dinosporines, structure de base des parois cellulaires des plantes supérieures et de certaines algues (Hahlbrock and Scheel, 1989).

Les tanins

Les tanins, complexes hydrophobes astringents en association avec des protéines, des polysaccharides, des alcaloïdes ou des bases puriques (Vercauteren, 2011). Ce sont des composés plutôt polaires à cause de leurs nombreuses fonctions phénoliques mais leurs noyaux aromatiques sont à l'origine d'une faible affinité pour l'eau et leur confèrent même, une certaine « lipophilie ». Les polyphénols sont donc amphiphiles. Ainsi, les mélanges "eau + alcool" ou "eau + acétone" sont de meilleurs solvants que l'eau seule ou l'éthanol ou l'acétone seuls, pour obtenir de tels extraits.

Les tanins de l'hamamélis sont utilisés par exemple en pommade pour le traitement d'appoint des dermites irritatives (HEC®). Les tanins de la salicaire sont utilisés comme antidiarrhéiques dans Elusanes salicaire®. D'autres tanins sont utilisés dans le traitement symptomatique de troubles digestifs (tanins du Rathania du Pérou, tanins de l'acacia à cachou), de l'insuffisance veinolymphatique (tanins de vigne, de pépins de raisin, de pin maritime).

Les résines

Les baumes sont des « oléo-résines » riches en acides benzoïques et cinnamiques et leurs esters. Ils « embaument » (odeur aromatique). Le baume de Tolu, obtenu des troncs de Myroxylon balsamum (L.) Harms var. balsamum, contenant 25 à 50 %MS d'acides libres ou combinés, est utilisé comme antiseptique et expectorant. Les sirops Phytotux® et Sodal® et les pastilles Vicks® menthol à l'eucalyptus en contiennent. Le baume du Pérou, obtenu des troncs de Myroxylon balsamum (L.) Harms var. pereirae, contenant 5 à 6 %MS d'acides libres et 50-60 % d'esters, est utilisé comme antiseptique et cicatrisant. La solution Balsofumine®, le baton à lèvres Dermophil indien®, les comprimés de Pérubore inhalation®, notamment, en contiennent. Les résines de tronc de Styrax sp. sont également riches en acides, avec des teneurs allant de 45 à 55 %MS. Ces résines sont aussi appelées benjoins. Le benjoin du Laos, extrait de Styrax tonkinensis, est utilisé en pharmacie dans le traitement d'appoint des états congestifs des voies aériennes supérieures, dans le traitement d'appoint de petites blessures buccales (aphtes, gingivites, parodontopathies, blessures légères par appareils de prothèse), dans le traitement local d'appoint des dermites irritatives et piqûres d'insectes. On la retrouve dans des solutions pour inhalation, comme Balsofumine® ou Euvanol®, et dans les pommades Inotyol® et Homeoplasmine®. Le Benjoin de Sumatra, extrait de Styrax benzoin, de moindre qualité, n'est pas utilisé en pharmacie, mais entre dans la composition de produits domestiques : encens à brûler, papier d'Arménie, « pots pourris »...

Les coumarines

Certaines coumarines augmentent la résistance et diminuent la perméabilité des capillaires sanguins (réduction des pétéchies). La plupart des furocoumarines (psoralène, bergaptène, xanthotoxine), sont photosensibilisantes et utilisables en puvathérapie (sous UV) dans le traitement du vitiligo et du psoriasis (20 à 60 mg/jour puis séance UVA). Cependant, elles présentent des risques de cancérisation avérés. Et certaines furocoumarines sont phototoxiques. Elles peuvent provoquer des dermites aiguës, avec hyperpigmentation persistante, dans le cas où le contact avec l'une ou l'autre de ces plantes est suivi d'une exposition aux UV solaires. Ils sont extraits du fruit des fèves de Tonka (coumarine), du marronnier d'Inde (esculoside), des parties aériennes de *Melilotus officinalis* (coumarine), de *Galium odoratum* (coumarine)... Notons que le dicoumarol, retrouvé dans le mélilot « pourri », possède des propriétés anti-coagulantes et a servi de modèle pour la synthèse des anticoagulants "coumariniques" de synthèse (Vercauteren, 2011).

Les lignanes

Les lignanes sont présents dans un grand nombre de familles botaniques et sont d'une grande diversité structurale. Ils ont pour point commun de dériver de la dimérisation de deux unités shikimates C9 (unité phénylpropanique) sous leur forme alcool ou acide cinnamiques. Chez les gymnospermes, ils sont accumulés dans le bois. Chez les angiospermes, ils sont retrouvés dans toutes les parties de la plante (Bruneton, 2009).

Ils assurent un rôle de défense (antibiotique, antifongique, antiparasitaire, répulsif pour les prédateurs herbivores). Les lignanes du Chardon-Marie et des Schizandracées sont utilisés pour leurs propriétés hépato-protectrices. D'autres lignanes sont étudiés pour leurs propriétés anti-inflammatoire, antiallergiques et anticancéreuses (Vercauteren, 2011). La podophyllotoxine est utilisée par exemple pour ses propriétés antimétaboliques dans Condylone®, solution pour application locale destinée à traiter les condylomes. C'est le lignane majoritaire d'une résine obtenue à partir du rhizome de *Podophyllum peltatum*. Les dérivés hétérosidiques de la podophyllotoxine, étoposide (VP-16®) et téniposide (Véhem®), obtenus par glucosylation et acétalisation, sont utilisés également comme anticancéreux pour leur activité inhibitrice de la topoisomérase II.

Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont très répandus chez les plantes supérieures, le plus souvent sous forme d'hétérosides. Ils sont stockés en général dans la couche externe des organes des plantes (épiderme des feuilles, pellicule des fruits), permettant d'attirer les insectes pollinisateurs grâce aux couleurs qu'ils prennent. Ils sont de structure Ar-C3-Ar. Les anthocyanes peuvent être considérés comme faisant partie des flavonoïdes « au sens large » mais ce ne sont clairement pas des lipides (structure hétérosidique).

Les flavonoïdes « vrais » sont traditionnellement utilisés dans les symptômes de l'insuffisance veino-lymphatique (douleurs, impatience de primo-decubitus, jambes lourdes, varices, hémorroïdes, ...) et de fragilité capillaire (purpuras, diabétiques, hypertendus). Les citroflavonoïdes sont utilisées dans le traitement des métrorragies lors de la contraception par microprogestatifs et des métrorragies dues au port du stérilet, et dans le traitement des signes fonctionnels liés à la crise hémorroïdaire. Ces molécules constituent les principes actifs de Daflon®, Bi-cirkan®, Cyclo-3-fort®, Diosmine®, Mediveine®, entre autres. Elles sont extraites de divers Citrus sp. (citron, pamplemousse, oranges). La rutine, désignée également sous le nom de rutoside, est un flavonoïde utilisé en association notamment dans la spécialité Esberiven fort® pour une action contre les insuffisances circulatoires cérébrales. Elle est extraite de la sophora, la rue, le sarrasin, ou l'eucalyptus. Le dérivé triéthoxyéthylé de la rutine, la troxérutine, possède l'avantage d'être facilement soluble dans l'eau et permet donc de proposer des spécialités sous forme de solutions aqueuses (ou pour solutions aqueuses) : Ginkor fort®, Troxerutine générique, Veinamitol®... Des flavonoïdes sont également extraits des feuilles de Gingko biloba. L'extrait sec raffiné contenant ces flavonoïdes contient également des terpènes. L'extrait total standardisé de Gingko est utilisé dans les spécialités Tanakan®, Ginkogink® et Tramisal®. Il est associé à des flavonoïdes notamment dans Ginkor fort®. Les indications de ces produits sont les traitements symptomatiques des déficits cognitifs et neurosensoriels chroniques du sujet âgé (à l'exception des démences), des symptômes en rapport avec des insuffisances veinolymphatiques, des baisses d'acuité auditive, des vertiges, des acouphènes (Vercauteren, 2011).

II.1.2 Les hydrocarbures d'origine biologique

La classification des lipides présentée dans le paragraphe précédent respecte principalement des critères de polarité et d'origine métabolique. Les hydrocarbures (HC), chaînes hydrocarbonées *stricto sensu*, se répartissent dans plusieurs de ces familles de lipides. C'est une famille transversale de lipides très diversifiée. Dans le cadre de cette thèse, le choix de l'espèce *B. braunii* a été motivé par sa particularité à synthétiser naturellement des HC avec des taux importants. Le paragraphe suivant précise la répartition des HC dans l'environnement en mettant en avant le cas particulier de la microalgue *B. braunii*.

a Répartition des hydrocarbures volatils

Une quantité considérable du carbone d'origine naturelle est contenue dans les HC volatils libérés dans l'atmosphère. Les plantes supérieures sont responsables de la synthèse de la majorité de ces molécules. Elles en synthétisent des millions de tonnes par an. Ces HC à très courte chaîne représentent donc un réservoir énergétique énorme. Des structures de différentes origines sont retrouvées : des dérivés d'acides aminés, des terpènes et des dérivés anthropogéniques. La durée de vie variable de ces composés, de moins d'une journée (C_5 et C_6 alcanes et alcènes) jusqu'à parfois 2 mois pour l'éthane (C_2), rend leur dosage difficile. Ils contribuent fortement à la production naturelle atmosphérique de monoxyde de carbone (CO) et entre en jeu dans le cycle de l'ozone (O_3). Il est à noter que les océans sont sursaturés en propane et en libèrent une grande quantité vers l'atmosphère (Vandecasteele, 2005).

i. Hydrocarbures volatils dérivés d'acides aminés

Les HC non isopréniques dérivant d'acides aminés, de C_2 à C_6 , sont volatils. L'éthylène en est un représentant important (Figure 12). Sa production naturelle atteint plusieurs dizaines de millions de tonnes par an. Il joue un rôle dans la maturation des fruits, la germination des graines, la résistance aux maladies. Dans le sol, l'éthylène est très vite dégradé sauf dans les sols anaérobiques où ils peuvent s'accumuler.

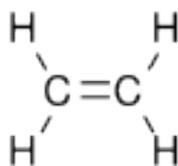


Figure 12 : structure de l'éthylène

ii. Hydrocarbures volatils dérivés d'acide gras

Certains HC linéaires, dérivés d'acides gras, sont aussi volatils. Ils sont en général impliqués dans la transmission de signaux entre individus (phéromones chez les insectes...).

iii. Hydrocarbures terpéniques volatils

Les émissions foliaires des terpènes volatils sont considérables (Leray, 2010; Vandecasteele, 2005). L'isoprène (Figure 13) est émis dans des quantités très importantes (5 millions de tonnes par an) par de nombreux végétaux (nombreux arbres caduques, nombreuses plantes herbacées) en réponse à un stress induit par la chaleur (Vandecasteele, 2005). Il jouerait un rôle de stabilisateur de membrane. Chez les mammifères, il est exhalé par les poumons, en quantités beaucoup plus faibles. Les monoterpènes (Figure 13) sont synthétisés chez de nombreux végétaux (menthe, agrumes, eucalyptus, conifères...) puis stockés dans des glandes spécialisées ou émis directement dans l'atmosphère. Ils joueraient aussi un rôle de stabilisateurs de membrane. Les homologues inférieurs des isoprénoïdes (mono et sesquiterpènes) sont rares chez les eubactéries (y compris les cyanobactéries) et sont exprimés dans des conditions physiologiques particulières.

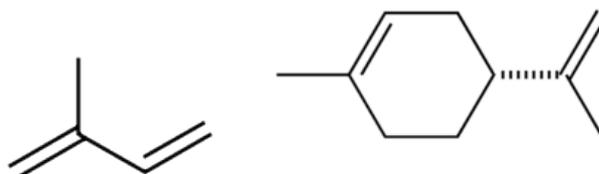


Figure 13 : structure de l'isoprène (à gauche) et du limonène (à droite), monoterpène à odeur d'orange.

De nombreux HC volatils sont aussi d'origine anthropique, particulièrement dans les zones urbaines (polluants). Les alcanes (C₂-C₅), majoritaires face aux HC aromatiques, peuvent atteindre des concentrations atmosphériques 10 à 100 fois plus élevées que dans les zones rurales où l'on retrouve plus d'isoprènes naturellement émis (Ladygina *et al.*, 2006). L'acétylène (éthyne) (Figure 14), par exemple, est considéré comme étant essentiellement anthropogénique (marqueur de la pollution de l'air par le trafic automobile). Il est très persistant dans l'atmosphère (2 mois). Par ailleurs, son émission atmosphérique est complétée par la combustion massive de biomasse (destruction des forêts par brûlis) et de carburants fossiles.



Figure 14 : structure de l'acétylène

b Répartition des hydrocarbures non volatils

Les HC non volatils constitutifs de la biomasse ont des taux (par rapport à la biomasse sèche) en général très faibles (<0,1%). Les hydrocarbures sont plus volontiers reconnus comme jouant un rôle physiologique très ciblé (hormone, régulation de la perméabilité membranaire...) plutôt qu'un rôle de réserve énergétique (Berkaloff *et al.*, 1983; Ladygina *et al.*, 2006).

i. Hydrocarbures non terpéniques

Chez les plantes supérieures, les HC linéaires sont principalement impliqués dans la composition de la couche de cire épicuticulaire dont la fonction première est de limiter la perte hydrique à travers l'épiderme. De plus, leur localisation en périphérie des cellules, leur permet de jouer un rôle dans les interactions avec des organismes pathogènes (protection, répulsion) ou non pathogène (reproduction, adhésion/dispersion) (Ladygina *et al.*, 2006; Vandecasteele, 2005). On retrouve aussi dans les cires cuticulaires, des esters, des alcools gras, des acides gras, et d'autres molécules à chaîne longue. Chez les insectes, les HC forment tout ou partie de la couche de cire de la cuticule, jouant de la même manière un rôle dans la prévention de la déshydratation. Chez les plantes, les chaînes hydrocarbonées des cires sont supérieures à C₂₀, souvent entre C₂₁ et C₃₇ (Kolattukudy, 1967; Vandecasteele, 2005).

Chez les vertébrés, les alcanes issus d'acides gras ont un rôle fondamental dans la structure de la myéline, structure permettant d'isoler les fibres nerveuses. Chez les oiseaux, les cires de protection sécrétées par certaines glandes sont le plus souvent constituées d'une majorité de monoesters mais leur teneur en alcanes impairs de C₂₁ à C₂₇ peut aller jusqu'à 40%.

Chez les bactéries, les HC non terpéniques sont rares (rarement plus de 1% de la matière sèche). Les chaînes sont plus longues chez les bactéries non-photosynthétiques (C₁₆-C₂₉) que chez les bactéries photosynthétiques (C₁₄-C₂₀). Les champignons et levures contiennent des n-alcanes et alcènes de C₁₆ à C₃₆. Certaines algues peuvent contenir des quantités non négligeables d'hydrocarbures saturés et insaturés de C₁₄ à C₂₀. Les souches de race A de l'algue *B. braunii* peuvent accumuler des quantités très importantes d'HC dérivés d'acides gras à longue chaîne (Ladygina *et al.*, 2006).

ii. Hydrocarbures terpéniques

Les archéobactéries présentent la particularité de construire tous leurs lipides à partir du diterpène diphosphate : chaînes phytanyle en C₂₀ et bisphytanyle en C₄₀. Ils jouent le rôle de stabilisateur de membrane. Les hopanoïdes, triterpénoïdes pentacycliques, sont caractéristiques d'un grand nombre d'eubactéries (Figure 15). Les hopanoïdes les plus simples (en C₃₀) ont été retrouvés chez quelques cryptogames (fougères, mousses, lichens, champignons inférieurs) et de nombreuses bactéries. Les hopanoïdes bactériens caractéristiques sont des molécules composites en C₃₅ appelés bactériohopanes. Ils jouent le rôle de stabilisateur de membrane comme les stérols chez les eucaryotes.

Les caroténoïdes sont des métabolites essentiels pour les organismes phototrophes car ils participent à la collecte d'énergie lumineuse. Par exemple, *Dunaliella salina* est connue pour produire une quantité relativement importante de carotènes (Tornabene *et al.*, 1980) (Figure 15). On les retrouve également chez de nombreux champignons et levures. Les polyprénols acycliques, homologues terpéniques les plus longs, sont très courants chez les végétaux supérieurs. Leur longueur de chaîne est plus souvent comprise en 10 et 100 unités isopréniques mais peut être bien supérieure comme pour le caoutchouc naturel avec 1400 unités (Vandecasteele, 2005).

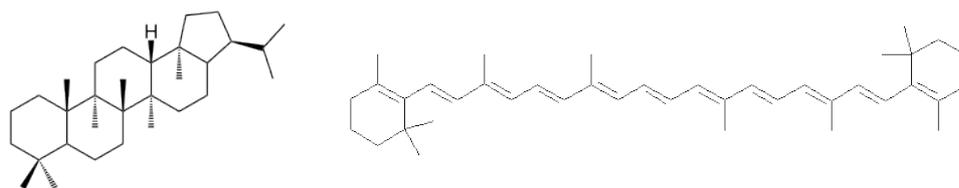


Figure 15 : structure de l'hopane (C₃₀, à gauche) et du β-carotène (C₄₀)

Le squalène lui-même peut avoir un rôle physiologique. Il représente chez les mammifères le principal HC de la barrière épidermique, au milieu de nombreux autres lipides (phospholipides, stérols, esters, acides gras...).

La capacité de synthèse en hydrocarbures semble être distribuée chez tous les microorganismes (Ladygina *et al.*, 2006). Certains HC sont considérés comme spécifiques de certains groupes biologiques (Ladygina *et al.*, 2006) et peuvent être utilisés comme marqueurs chimiotaxonomiques. Par exemple, les 7- et 8-méthylheptadécane sont spécifiques des cyanobactéries, le pristane et le phytane des bactéries photosynthétiques (Figure 16), les HC ramifiés souvent d'une origine bactérienne marine, alors que les HC à longues chaînes sont souvent prédominants chez les champignons. Chez les microalgues, les botryococcènes sont des triterpènes pluriméthylés spécifiques de certaines souches (race B) de l'espèce *B. braunii*.



Figure 16 : structure du pristane (C₁₉, à gauche) et du phytane (C₂₀, à droite)

iii. Hydrocarbures aromatiques

Les HC aromatiques retrouvés dans l'environnement, lacs et atmosphère, sont principalement anthropogéniques. Ils sont souvent utilisés pour évaluer la pollution (toluène). Ils peuvent être monocycliques et polycycliques (HAP). Ces derniers sont retrouvés en quantité importante dans l'environnement. Les émissions atmosphériques sont estimées à plusieurs milliers de tonnes par an. Ils sont produits par combustion incomplète de combustibles fossiles (chauffage domestique, trafic automobile, activités industrielles). De la même manière, les feux de forêt et les éruptions volcaniques contribuent aux émissions de HAP (pyrolyse naturelle) (Vandecasteele, 2005) (Figure 17).

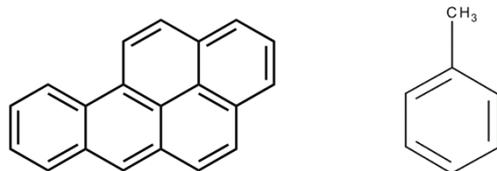


Figure 17 : structure du toluène (C₇, à gauche) et du benzo(a)pyrène (C₂₀, à droite), exemples de HAP.

Une petite contribution biogénique est aussi retrouvée dans les fonds anoxiques de certains lacs où plusieurs microorganismes sont impliqués dans la synthèse d'HC monoaromatiques (toluène, xylène, styrène) par dégradation d'acides aminés, mais leur contribution est mineure.

c Le pétrole brut : hydrocarbures des sédiments d'origine biologique

Le pétrole brut est un mélange de lipides dominé par les HC. Une part de ce mélange est cependant composée de molécules azotées, soufrées ou oxygénées. Toutes ces molécules sont issues initialement de la biomasse et ont subi un long parcours vers une « fossilisation » (diagenèse, pressions, températures extrêmes...), convergeant vers une simplification des structures, d'abord organiques puis minérales, majoritairement hydrocarbonées. Le squelette carboné de ces lipides est en général chimiquement stable, peu réactif et relativement résistant à la biodégradation en ce qui concerne les composés à squelettes ramifiés ou polycycliques. On peut parler de fossiles moléculaires (Vandecasteele, 2005).

Les HC des sédiments sont très étudiés en biogéochimie organique. Ils sont très utilisés pour connaître l'origine des sédiments eux-mêmes et des pétroles (terrestre, limnétique ou marine) mais aussi pour connaître leur évolution microbiologique (biodégradation). En effet, les HC fossiles sont initialement d'origine terrestre ou aquatique. Les HC naturels produits par les organismes aquatiques sont répartis dans l'environnement sous forme dissoute, colloïdale ou particulaire dans les environnements aqueux. Ils sont rejoints par une partie des HC d'origine terrestre transportés dans les rivières et les lacs. L'autre partie se retrouve dégradée et humifiée dans les sols. Ensuite, ces molécules sont finalement incorporées aux sédiments et/ou biodégradées.

Les triterpènes tétracycliques et pentacycliques sont peu biodégradables et fournissent une empreinte caractéristique dans tous les sédiments. La présence de fossiles de triterpénoïdes pentacycliques dans les sédiments indique un apport terrestre significatif, dû aux végétaux

supérieurs ou aux eubactéries (hopanoïdes). De nombreux triterpénoïdes sont les précurseurs d'HC fossiles. Les fossiles de sesquiterpènes et diterpènes sont rarement rencontrés. Les caroténoïdes, malgré leur grande labilité, peuvent se retrouver dans les sédiments en milieu anoxique. Les terpénoïdes des animaux ou des champignons contribuent généralement faiblement à la matière organique des sédiments (Vandecasteele, 2005).

Parmi les HC fossiles, ceux des botryococcènes (triterpènes spécifiques de la race B de l'espèce *B. braunii*) sont spécifiques de certains sédiments à fort potentiel en HC (Derenne and Largeau, 2001), au même titre que certains fossiles de source terrestre ou de source marine. L'espèce *B. braunii* est ainsi impliquée dans la formation de réserves fossiles depuis l'Ordovicien (485-445 millions d'années) jusqu'à aujourd'hui (Cane, 1969; Cane and Albion, 1973) et est bien connue pour avoir produit les « bog-heads », houilles riches en matières volatiles, intermédiaires entre le charbon et les schistes bitumeux (Couté, 1987). Les premiers de ces sédiments proviennent du Précambrien (1,7 milliards d'années) (Vandecasteele, 2005) et sont caractéristiques du Carbonifère et du Permien (environ 260 millions d'années). Toute cette littérature atteste de l'abondance et de la fréquence de l'apport de l'espèce *B. braunii* dans les réserves de pétrole brut de la planète.

II.2 Les lipides de l'espèce *Botryococcus braunii*

L'espèce *B. braunii* synthétise les mêmes lipides classiques que toutes les microalgues (acides gras, stérols, caroténoïdes) mais aussi, et c'est ce qui fait sa particularité, des lipides atypiques riches en motifs hydrocarbonés et souvent en quantité très importante (hydrocarbures, polymères, et autres lipides originaux). La longueur des motifs hydrocarbonés procure un très fort caractère apolaire à ces lipides, ce qui les rend en général solubles dans des solvants comme l'hexane. Or, certains auteurs réduisent parfois (à tort) le dosage des hydrocarbures de *B. braunii* aux molécules solubles dans ce solvant, ce qui a pour résultat de surestimer leur proportion dans la biomasse. Ce paragraphe présente les lipides classiques de *B. braunii*, ainsi que ses HC et ses lipides originaux. Il met en évidence la place particulière qu'occupe cette espèce, du point de vue de sa composition en lipides, non seulement parmi les algues mais aussi dans le monde vivant. Plusieurs facteurs font l'originalité de l'espèce : la structure de ses lipides atypiques et sa capacité à les accumuler.

II.2.1 Les lipides classiques chez *B. braunii*

a Acides gras

Toutes les souches de *B. braunii*, quelle que soit leur race, produisent et accumulent des acides gras. Peu de profils d'acides gras ont été publiés car les études sont presque toujours orientées sur les HC de *B. braunii*. Metzger *et al.* (1990) en mesurent 5 à 14 % de la biomasse sèche en phase stationnaire de croissance. Leurs chaînes sont saturées ou monoinsaturées, de C₁₄ à C₃₂ (Metzger and Largeau, 1999; Metzger *et al.*, 1990). Quelques acides bi-insaturés ont été identifiés. Dans les trois races, les principaux acides gras sont l'acide palmitique (C₁₆), l'acide oléique (C₁₈) et l'acide octacosénoïque (C_{28:1}). Les acides gras sont principalement présents dans les TAG et dans les lipides éthers (§0).

Dans la race A, l'acide oléique prédomine largement en représentant plus de 80 % des acides gras totaux. Cette prédominance est probablement due à son rôle de précurseur dans la synthèse des HC linéaires de cette race (Metzger and Largeau, 1999). Des acides gras originaux, impairs triméthylés de C₂₃ à C₂₉, ont aussi été identifiés, en faible quantité, dans une souche bretonne de race A (Metzger *et al.*, 1991)

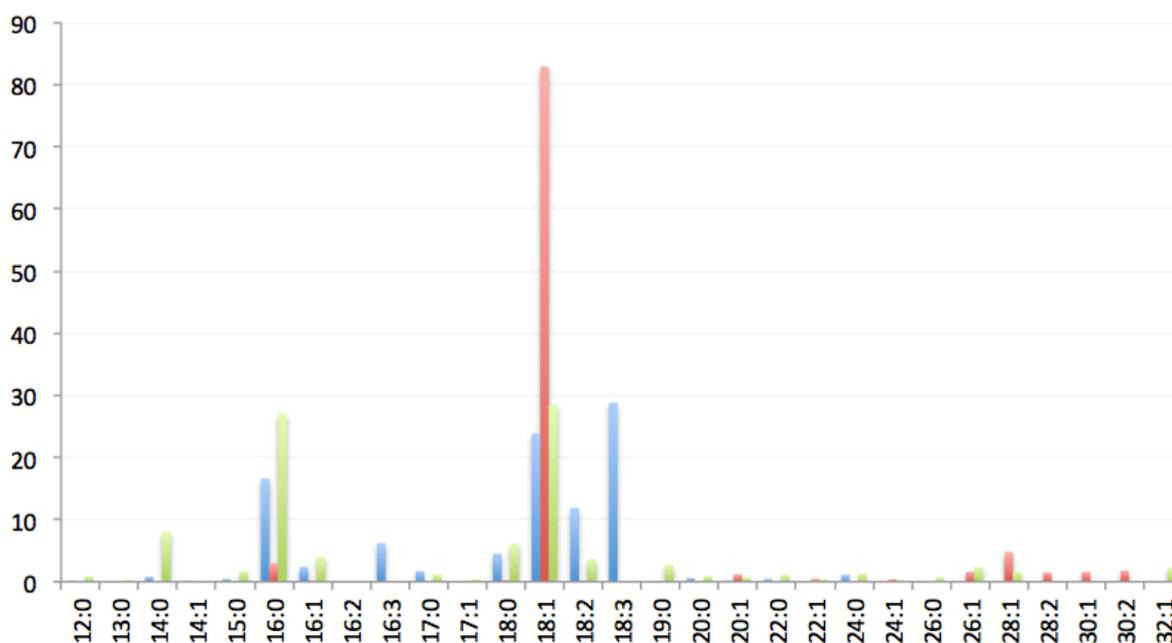


Figure 18 : exemples de profils d'acides gras de souches de race A : souche 807/1 en bleu (Kalacheva *et al.*, 2002), souche Austin en rouge (Metzger *et al.*, 1989), souche du lac Shira en vert (Volova *et al.*, 2003)

Les taux d'acide palmitique et oléique dans les souches de races B et L sont classiques pour des algues vertes (Metzger *et al.*, 1990). La forte proportion d'acide octacosénoïque (C_{28:1}) est au contraire inhabituelle, jusqu'à 18% dans une souche de race L.

b Stérols

Les stérols sont présents nativement à l'intérieur des cellules. Ils représentent 0,1 à 0,2 % de la matière sèche (%MS). Des traces sont retrouvées dans l'extrait extracellulaire. Les trois races expriment les mêmes stérols principaux : cholest-5-en-3 β -ol (C₂₇H₄₆O), 24-methylcholest-5-en-3 β -ol (C₂₈H₄₈O) et son homologue 24-ethyl (C₂₉H₅₀O). Ces stérols sont présents aussi chez d'autres algues vertes. D'autres stérols, comme le cholestérol, sont retrouvés en plus faibles proportions. Deux autres stérols importants ont été retrouvés uniquement dans une souche de race L et non identifiés (C₂₈H₅₂O, C₃₀H₅₆O) (Metzger *et al.*, 1990).

c Caroténoïdes

Les souches de races B et L changent en général de couleur lorsqu'elles entrent en phase stationnaire de croissance. Elles deviennent oranges à rouges par l'accumulation de caroténoïdes (0,2-0,4 %MS). Ce changement est moins marqué chez les souches de race A, qui deviennent toujours vert pâle à jaune pâle.

En phase linéaire de croissance, la lutéine est le caroténoïde majoritaire. En phase stationnaire, canthaxanthine et échinénone prédominent (Grung *et al.*, 1989). Il a été montré que ces deux derniers sont transférés vers la matrice extracellulaire tout au long de la croissance de l'algue. Leur synthèse serait favorisée par l'absence d'azote dans le milieu de culture (Grung *et al.*, 1989).

Certains caroténoïdes isolés de cultures de *B. braunii* ont des structures originales et pourraient donc être utilisés comme chimiomarqueur de l'espèce. Un d'entre eux a été baptisé botryoxanthine A, associant l'échinénone et un tétraterpène par un groupement cétal. Il a été isolé de la souche Showa de race B (Okada *et al.*, 1996).

**Tableau 1 : caroténoïdes identifiés dans des souches de races B et L
(Grung *et al.*, 1989, 1994; Okada *et al.*, 1996)**

Caroténoïdes des races B et L
(6'R) β,ε-carotène
(3R, 3'R, 6'R) lutéine
(3R, 3'R, 6'R) loroxanthine
β,β-carotène
(3R, 3'R) zéaxanthine
(3S, 3'R) adonixanthine
(3S, 3'S) astaxanthine
(3R, 5R, 6S, 3'S, 5'R, 6'S) violaxanthine
(3S, 5R, 6R, 3'S, 5'R, 6'S) néoxanthine
Echinénone
(3S, 3'R) hydroxyechinénone
(3S) 3-hydroxyechinénone
Canthaxanthine
Braunixanthines
Botryoxanthines

II.2.2 Hydrocarbures

B. braunii peut produire des HC originaux et en forte proportion (15-60 %MS) à longue chaîne (>C₂₀). L'étude de ces HC extracellulaires est comparable à celle des HC des cires épicuticulaires des plantes supérieures. On retrouve en effet des traits similaires comme leur localisation autour des cellules, l'accumulation de ces HC dans la matrice (sorte de cuticule), la longueur des chaînes (Largeau *et al.*, 1980b). Metzger and Largeau (2005b) ont proposé de classer les souches suivant la structure de leurs HC majoritaires. L'utilisation de cette classification en trois races (A, B, L) est aujourd'hui largement utilisée.

a Race A : hydrocarbures linéaires insaturés

Une grande variabilité dans la composition et les taux d'HC mesurés caractérise les souches de race A. Cette variabilité est observée même pour des conditions de culture identiques (Metzger and Largeau, 1999), d'une souche à une autre.

i. Quantités produites

Les taux d'HC reportés dans la littérature pour les souches de race A s'étalent de moins de 1% jusqu'à plus de 60 %MS (Tableau 2), représentant de 3 à 88 % des lipides totaux (%LT) (Metzger *et al.*, 1988, 1997). Les conditions de culture modifient énormément la teneur en HC des souches de race A. Elle peut être de 5 %MS en culture standard (fioles d'Erlenmeyer non bullées) à 20 voire 60% en culture aérée avec 1% de CO₂ dans l'air, suivant la souche cultivée.

Tableau 2 : présentation de la plupart des souches de race A ayant fait l'objet de publications

Origine de la souche	Souche	Taux d'HC (%MS)	Biotope d'origine	Références	Lieu de conservation de la souche
Australie	Tarago	30	-	Wake hillen 1981	-
	Sorrento	27-30	-	Wake hillen 1981	-
	Jillamatong (4 souches)	5 à 15	Lac éphémère d'eau saumâtre	Metzger 1997	-
Bolivie	Challapata	6	Lac de barrage /pH7,8/16°	Metzger 1989	AC 758
	Overjuyo	1,9	Lac de vallée /pH7,3/11°	Metzger 1989	-
	Pota Khota	52	Lac /pH6,9/6°	Metzger 1989	-
	Titicaca	13	Lac /pH8,4/15°	Metzger 1989	-
	Icha Khota	0,9	-	Metzger 1996	-
Angleterre	Maddingley Brick Pits	9	-	Knights 1970	-
	Grasmere	28	-	Metzger 1997	CCAP 807/2
France	Chaumeçon	61	Lac de barrage/pH6,1/16,6°	Metzger 1985	-
	Crescent	40	Lac de barrage/pH7/15,5°	Metzger 1985	-
	Lingoult	32	Petit bassin/pH6,9/15°	Metzger 1985	AC 755
	Grosbois	-	-	Metzger 1986	-
	Coat ar Herno	1,6	lac	Metzger 1987	-
Japon	Yamanoka	16	-	Okada 1995	-
Maroc	Oukaimden	19-40	Petit bassin/pH6,6/15°	Metzger 1985	AC 757
Portugal	Amieiro	0,09	Petit bassin	Metzger 1997	Coimbra N°58

ii. Structures des hydrocarbures de race A

Une cinquantaine d'HC à chaîne normale (linéaire) ont été détectés chez des souches de race A. Trente structures ont été élucidées (Metzger and Largeau, 1999) (Tableau 3). Ils ont toujours un nombre impair de carbones, de C₂₃ à C₃₃, à l'exception des HC d'une souche où ont été extraits de faibles quantités de C₂₆ et C₂₈. Les C₂₇, C₂₉ (le plus souvent) ou C₃₁ trans-diéniques et/ou triéniques sont majoritaires (Metzger and Largeau, 1999; Metzger *et al.*, 1997) (Figure 19).

Les HC de la race A possèdent toujours une double liaison terminale (Metzger, 1993). Les formes diéniques sont en général majoritaires, en particulier la configuration ω -9(Z). Quelques souches synthétisent préférentiellement des triènes. Des monoènes et tétraènes sont parfois retrouvés mais ne sont jamais majoritaires.

Tableau 3 : structure des hydrocarbures de race A (Metzger and Largeau, 1999)

Structure	Longueur de chaîne	Insaturations
Chaînes normales monoènes (toujours minoritaires)	C ₂₃ -C ₂₇ impairs	Une double liaison terminale
Chaînes normales diènes (en général majoritaires)	C ₂₃ -C ₃₃ impairs	Une double liaison terminale et une en ω 9 (cis ou trans)
Chaînes normales triènes (parfois majoritaires)	C ₂₇ -C ₃₁ impairs	Une double liaison terminale. Deux double liaisons conjuguées (ω 7 et ω 9) (cis,cis ou cis,trans)
	C ₂₇	Une double liaison terminale conjuguée avec une deuxième en C ₃ . Une troisième double liaison en C ₁₈ .
Chaîne normale tétraène (toujours minoritaires)	C ₂₇	Une double liaison terminale conjuguée avec deux autres en C ₃ (cis ou trans) et C ₅ (toujours trans). Une quatrième double liaison en C ₁₈ (cis ou trans).



Figure 19 : C₂₇ alcaadiène (a), C₂₇ alcatriène (b).

iii. Biosynthèse

Le mécanisme de biosynthèse de ces HC a fait l'objet de diverses études. Ils sont synthétisés à partir d'acide gras par élongation puis décarboxylation. Plusieurs expériences d'enrichissement avec des précurseurs acides gras marqués montrent que l'acide oléique serait le précurseur, probablement unique, de ces hydrocarbures (Casadevall *et al.*, 1985a; Metzger *et al.*, 1986a; Templier *et al.*, 1991). Les analyses transcriptomiques récentes d'une souche de race A ont permis de mettre en évidence des gènes candidats pour la synthèse de la majorité des enzymes impliquées dans la biosynthèse des acides gras à très longues chaînes (VLCFA), précurseurs des HC de race A (Baba *et al.*, 2012; Ioki *et al.*, 2012).

b Hydrocarbures de race B

Les souches de race B ont des profils HC relativement différents. Ces profils, pour une même souche, varient peu au cours du temps. Par contre le profil d'HC est très dépendant des conditions de culture, par exemple lorsqu'une souche passe d'un milieu non aéré à un milieu aéré avec 1% CO₂. L'expression des HC est donc souche-dépendant (facteurs génétiques) et conditions-dépendant (facteurs physicochimiques) (Metzger *et al.*, 1985a).

i. Quantités produites

Les quantités produites par les souches de race B sont variables mais sont en général plus élevées que dans les souches de race A (Tableau 4). Leur taux varie de 8% à 40%MS (Metzger and Largeau, 1999).

Tableau 4 : présentation de la plupart des souches de race B ayant fait l'objet de publication

Origine de la souche	Souche	Taux d'HC (%MS)	Habitat naturel d'origine (type de plan d'eau, pH, température de l'eau)	References	Lieu de conservation de la souche
Australie	Darwin river reservoir	29-33		Wake et Hillen 1981	
	Devilbend	40		Wake et Hillen 1981	
	Green Lake	27		Wake et Hillen 1981	
	McCay's reservoir	32		Wake et Hillen 1981	
	Coolamatong			Summons et Capon 1991	
Bolivie	Overjuyo	nd	Lac /pH7,3 /11°	Metzger 1988	AC 762
Angleterre	Oak Mere	76		Maxwell 1968	
France	Sanguinet	34	Grand lac/pH6,8/24°	Metzger 1985a	
	Pareloup (région de Rodez)	nd	Lac de barrage /pH6,7/19°	Metzger 1988	
	Vioreau	nd	Lac de barrage	Metzger 1988	
Côte d'Ivoire	Ayame	27	Lac de barrage /pH5,7 /30,8°	Metzger 1999	AC 759
	Taabo	20	Lac de barrage /pH5,5 /32,7°	Metzger 1999	
	Yamoussoukro	nd	Lac /pH5,5 /27,7°	Metzger 1988	
Japon	Yayoi	33		Okada 1995	
	Kawaguchi	10		Okada 1995	
	BOT70	nd	Bassin à Hiroshima	Tanoi 2011	Watanabe lab
	BOT22	nd	Réservoir à Okinawa	Sakamoto 2012	Watanabe lab, NIES
	Tsukuba-1 (nom déposé : FERM ABP 11441)	nd		Brevet US2013/0252304A1	National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depository IPOD
Philippines	Katugday	nd		Metzger 1988	
Thaïlande	Khao Kho Hong	8		Metzger 1988	
Etats-Unis	Michigan	nd		Wolf et Cox 1981	
	Norman	nd		Wolf et Cox 1981	
	Berkeley	24-39		Wolf 1985a	
Venezuela	Caroni river	nd		Jaffé 1995	
Martinique	La Manzo	32-43	Grand lac de barrage/pH5,7/34°	Metzger 1985a	AC 763
	Paquemar	28-38	Petit bassin/pHpH6,6/32°	Metzger 1985a	AC 761
Guadeloupe	Chateaubrun	37	Petit bassin/pH5,8/32°	Metzger 1985a	

ii. Structures des hydrocarbures de race B

La race B produit majoritairement des triterpènes acycliques et cycliques C₃₀-C₃₇, appelés botryococcènes (Figure 20), et aussi de faibles quantités de squalènes méthylés C₃₁-C₃₄ (Huang and Dale Poulter, 1989; Metzger *et al.*, 2008; Summons *et al.*, 2002). Ces polymethylsqualènes sont en général retrouvés en quantité-minute (présent transitoirement dans la cellule avant d'être métabolisés). Ils seraient utilisés rapidement dans la synthèse du polymère de paroi. Les botryococcènes sont des triterpènes cycliques ou acycliques. Plus de 50 composés ont ainsi été identifiés. Les structures de 16 d'entre eux ont été élucidées. Leur

formule générale est C_nH_{2n-10} avec $n=30-37$. Des profils très différents obtenus par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) sont observés, montrant la présence de nombreux isomères et montrant la prédominance d'un isomère, en général un C_{34} (Metzger and Largeau, 1999).

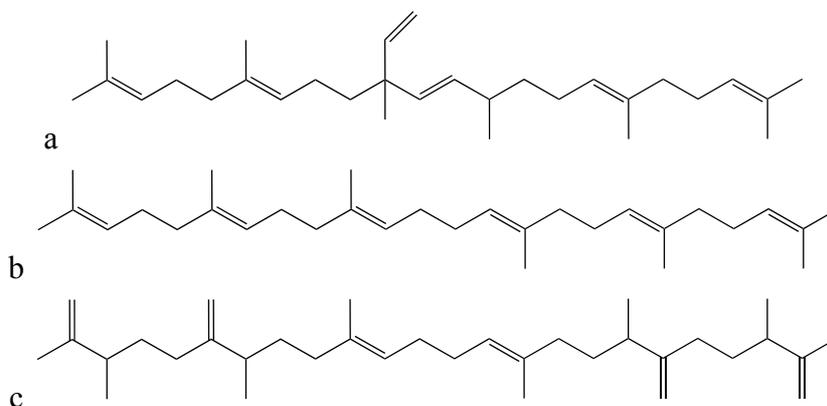


Figure 20 : structure du botryococcène C30 (a), du squalène C30 (b) et du tétraméthylsqualène C34 (c).

La purification des HC extraits est souvent difficile car le mélange obtenu est souvent complexe, ce qui rend leur identification difficile. De plus, une fois purifiés, ils polymérisent facilement (Metzger and Largeau, 1999) ce qui nécessite de prendre des précautions pour les conserver et les garder solubles.

iii. Biosynthèse

L'analyse transcriptomique d'une souche de race B suggère que la voie mévalonate indépendante (MVI) serait privilégiée par rapport à la voie du mévalonate (MVA), car les enzymes impliquées dans la synthèse de xylulose-5-phosphate y sont surexprimées (Watanabe and Tanabe, 2013). Des peptides impliqués dans le transport de certaines enzymes impliquées dans les premières réactions de la voie MVI ont été trouvés dans une souche de race B. Aucun peptide de ce type n'a été cependant trouvé sur les dernières enzymes de cette voie. Cela suggère une première partie de la voie de synthèse située dans le chloroplaste, la fin de cette voie ayant lieu dans le cytoplasme (Watanabe and Tanabe, 2013).

Les botryococcènes sont synthétisés à partir d'un homologue botryococcène C_{30} puis méthylés de 1 à 7 fois. Une cyclisation peut suivre à l'extrémité de la molécule. Le squalène est présent dans tous les extraits d'HC des souches de race B mais ne serait pas le précurseur des botryococcènes méthylés. Le squalène et le botryococcène (C_{30}) auraient le même précurseur direct, le presqualene pyrophosphate (Huang and Dale Poulter, 1989; White *et al.*,

1986), intermédiaire biosynthétique formé par la condensation de deux sesquiterpènes (C₁₅). L'expression de la voie du squalène ou des botryococcènes serait simplement conditionnée par la régiosélectivité des enzymes de chaque voie, squalène synthase et botryococcène synthase) de biosynthèse (Huang and Dale Poulter, 1989; White *et al.*, 1992).

L'étude de la méthylation du botryococcène, précurseur en C₃₀, a clairement montré que la méthionine sert de donneur de méthyl, au moins pour les positions C₃, C₇, C₁₆ et C₂₀ (Metzger *et al.*, 1986b). D'autres expériences ont montré que chaque botryococcène servait de précurseur pour son homologue supérieur par méthylations successives (Metzger *et al.*, 1985a, 1986b; Wolf *et al.*, 1985). L'accumulation d'un botryococcène serait donc finalement la conséquence d'une régulation de la méthylation, sous l'influence de facteurs génétiques et physicochimiques. Ces méthylations finales sont catalysées par la S Adenosyl-Méthionine (SAM) (Watanabe and Tanabe, 2013).

c Hydrocarbures de race L

Les souches de race L ont été moins étudiées. Elles sont caractérisées par des taux d'hydrocarbures plus faibles que les autres races mais l'huile produite est composée d'un seul hydrocarbure, le lycopadiène.

i. Quantités produites

Les souches de race L produisent des hydrocarbures en moindre quantité que les souches des autres races, de 0,07% à 8% suivant la souche (Metzger *et al.*, 1997)(Tableau 5). Le taux de lycopadiène est maximum en fin de croissance active (Metzger *et al.*, 1990).

Tableau 5 : présentation de la plupart des souches de race L ayant fait l'objet de publications

Origine de la souche	Souche	Taux d'HC (%MS)	Conditions de culture	References	Lieu de conservation de la souche
Inde	Kulavai (2souches)	< 0,1	Lac	Metzger 1997	MCRC Bocc4/1994, MCRC Bocc3/1994
Côte d'Ivoire	Kossou	nd	Lac/pH5,5/30,5°	Metzger 1990	AC 760, AC 765
	Yamoussoukro	3		Metzger 1990	AC 766, AC 768
Thaïlande	Khao Kho Hong	2-8		Metzger et Casadevall 1987	
	Songkla Nakarin University	nd	Réservoir /pH6,8 /27°		AC 767

ii. Structure des hydrocarbures de race L

Un seul HC est retrouvé dans l'extrait lipidique : le lycopadiène (Figure 21). C'est un tétraterpène (C_{40}) de formule $C_{40}H_{78}$, composé de deux doubles liaisons non conjuguées au milieu du squelette carboné.

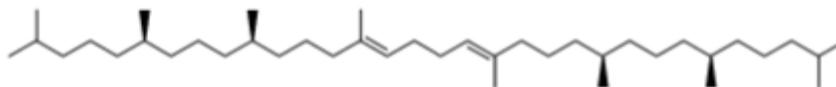


Figure 21 : structure du lycopadiène (C_{40}).

iii. Biosynthèse

Le mécanisme de biosynthèse du lycopadiène n'est pas encore élucidé. Il pourrait être synthétisé par condensation de deux molécules de phytol ou par réduction d'un caroténoïde acyclique comme le lycopène (Metzger and Largeau, 1999).

II.2.3 Lipides originaux de *B. braunii*

a Les botryals, aldéhydes gras α -branchés (race A)

Toutes les souches de race A produisent des aldéhydes gras α -branchés à chaîne longue, baptisés botryals, en proportion en général faible mais pouvant aller jusqu'à 18 % de la biomasse sèche (Metzger and Casadevall, 1989). Leur structure est originale de par la longueur de leur chaîne carbonée, chaîne paire de C_{52} à C_{64} (Figure 22). Ils possèdent trois double liaisons : une en ω_9 de chaque extrémité (ω_9 et ω_9') et une au milieu de la molécule conjuguée avec la fonction aldéhyde. La souche du lac Coat-ar-Herno présente, comme pour les acides gras, des aldéhydes gras originaux triméthylés impairs de C_{23} à C_{29} (Metzger *et al.*, 1991).

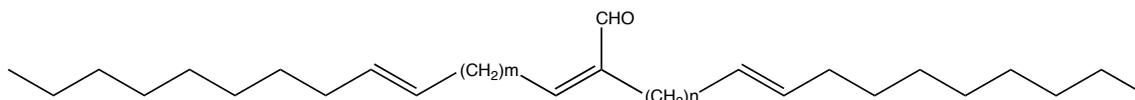


Figure 22 : structure des botryals (m : impair de 15 à 21 ; n : pair de 14 à 20)

Ces aldéhydes sont synthétisés par condensation de deux aldéhydes précurseurs pairs C_{26} à C_{32} , eux-mêmes formés par condensation d'unités C_2 . La similarité de structure entre les acides gras originaux de la souche de Coat-ar-Herno et ses aldéhydes gras suggère que les voies de biosynthèse pour les deux types de molécules sont proches, avec des intermédiaires communs.

b Braunicétals : terpène et aldéhyde macrocyclique reliés par liaison acétal (race B et L)

Des acétals de structure originale ont été étudiés récemment. Leur étude fait suite à la découverte d'alcane macrocycliques originaux, marqueurs de la présence de l'espèce *B. braunii* dans des sédiments. Ces molécules pourraient être les fossiles de métabolites de l'algue *B. braunii* (Audino *et al.*, 2002). En effet, des terpènes reliés par liaison acétal à un macrocycle ont été isolés de souches de race B et L (Metzger *et al.*, 2008) (Figure 23). Ce type de cycle serait le premier exemple de macrocycle (C_{31} - C_{33}) ne portant pas d'hétéroatome chez une algue. Ils sont retrouvés en faible proportion, toujours moins de 0,2% de la masse sèche. Aucune structure de ce type n'a été isolée de la race A.

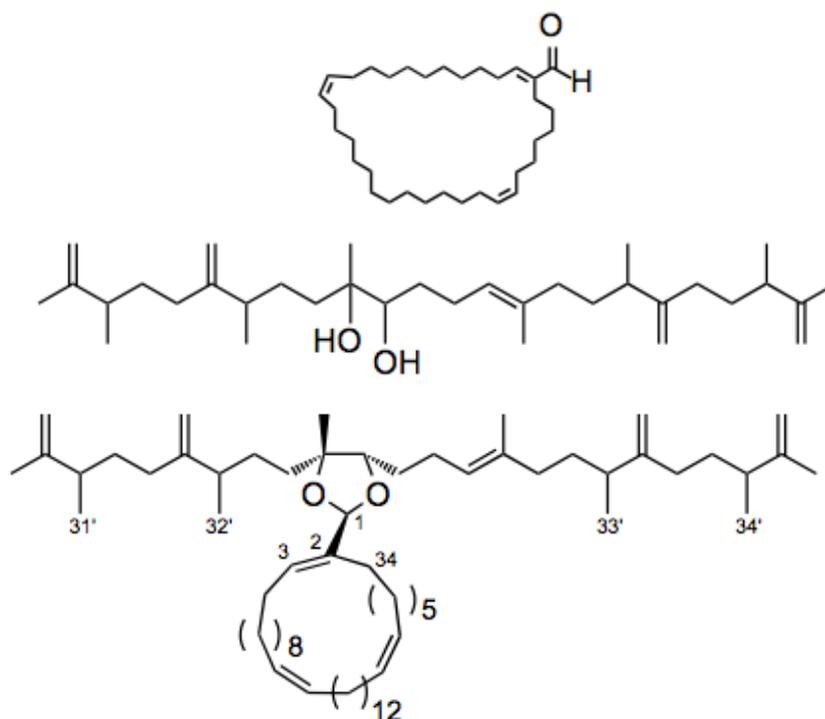


Figure 23 : structure d'un aldéhyde macrocyclique (C₃₄), du tétraméthylsqualène diol (C₃₄) et du braunicétal résultant de l'association des deux molécules (C₆₈).

Metzger *et al.* (2008) proposent un schéma de l'incorporation des braunicétals au sein du polymère polyaldéhydique (Figure 24). Ils seraient en contact direct avec les chaînes polyaldéhydiques mais sans liaison covalente, le macrocycle étant formé autour du polyaldéhyde. Cette organisation pourrait expliquer les propriétés élastiques des polymères de *B. braunii* et leur aptitude à gonfler dans certains solvants, propriétés observées avec les polyrotaxanes, polymères synthétiques présentant une organisation similaire (Takata, 2006). Notons que d'autres fonctions acétals sont retrouvées dans les polymères polyaldéhydes, reliant le squelette polyaldéhyde à des diols triterpéniques (race B) et tétraterpéniques (race L).

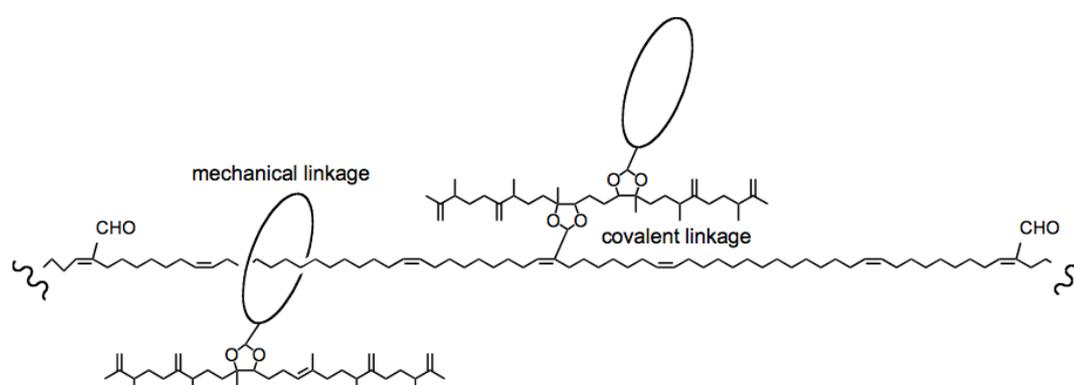


Figure 24 : proposition d'association (non covalente) des braunicétals avec les polyaldéhydes.

La voie de biosynthèse des braunicétals serait proche de celle des polyaldéhydes chez *B. braunii*. Les précurseurs α,ω -dialdéhydes formeraient, par aldolisation/déshydratation de deux fonctions aldéhydes, majoritairement une chaîne polyaldéhyde par réaction des aldéhydes de deux molécules voisines, minoritairement un braunicétal, macrocycle monoaldéhyde, par réaction des deux aldéhydes d'une même molécule (Metzger *et al.*, 2008). Ce braunicétal est formé par réaction de cet aldéhyde macrocyclique avec un diol triterpénique (race B) ou tétraterpénique (race L).

c Alkylphénols de *B. braunii* (race A principalement)

Plusieurs types d'alkylphénols ont été isolés des souches de race A. Toutes les souches de cette race en produisent. La structure de ces composés phénolique n'est pas retrouvée dans d'autres organismes vivants et la proportion produite par *B. braunii*, très dépendante de la souche, ferait de cette algue le plus grand producteur de composés phénoliques du monde vivant (Metzger, 1994) (Figure 25). La chaîne hydrocarbonée de ces molécules va de C₂₅ à

C₃₁. L'extrémité aromatique peut être un pyrogallol dimethyl ether ou un resorcinol dimethyl éther.

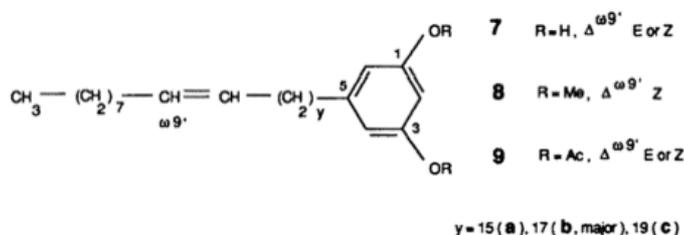


Figure 25 : structure des alkyphénols de *B. braunii*.

Ce type de composés est inhabituel chez les microalgues. Ils ont été principalement décrits chez les plantes terrestres, où ils permettent une protection contre les agressions oxydatives et biologiques. Ils absorbent fortement dans l'UV à 289, 222 et/ou 215 et/ou 203 nm (Metzger, 1994; Metzger and Casadevall, 1989). La localisation de ces phénols dans la paroi extracellulaire chez *B. braunii*, participe probablement à protéger l'algue contre ces agressions extérieures. La race A est en effet la seule à produire des hydrocarbures linéaires, composés connus pour être facilement dégradés par des bactéries ou des champignons (Watkinson and Ratledge, 1978). Les terpènes, chez les souches de race B et L, n'auront pas eu besoin dans leur évolution d'une telle protection par des phénols, car ils sont naturellement beaucoup plus résistants (Metzger and Largeau, 1999; Metzger *et al.*, 1990). Néanmoins, les souches de race B et L synthétisent des α et β-tocophérols (vitamines E) qui sont des composés antioxydants. Ce sont des composés fréquents chez de nombreux microorganismes, en particulier les microalgues, mais absents des souches de race A. Ils permettent de protéger les lipides proches contre une dégradation oxydative.

d Epoxydes (A, B, L)

Des époxydes sont retrouvés dans toutes les souches et parfois dans des proportions importantes. Ils sont des intermédiaires clés de lipides plus complexes. Après ouverture du cycle époxyde, la molécule donne naissance à deux fonctions oxygénées côte-à-côte, impliquées notamment dans les liaisons acétals abondantes dans le polymère de matrice (polyacétals).

Trois types d'époxydes ont été isolés de la souche Austin (race A) pour un total de 4% de la biomasse sèche (Metzger and Casadevall, 1989). Dans cette souche, ils sont formés sur des hydrocarbures normaux (n-alcènes) (Figure 26), sur des aldéhydes gras et sur des alkylphénols. L'époxydation a lieu sur la double liaison en position ω_9 .

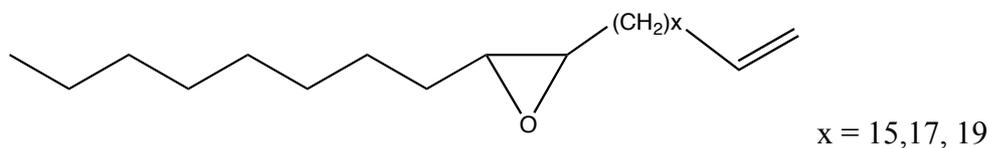


Figure 26 : structures des n-alcènes époxydes

Dans la souche La Manzo (race B), 0,8 % d'époxydes ont été extraits. Ils ont une structure isoprénique, formés par époxydation de polyméthylsqualène C_{32} , C_{33} et C_{34} (Delahais and Metzger, 1997) (Figure 27).

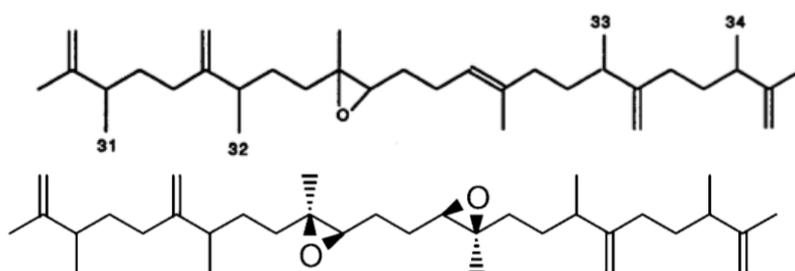


Figure 27 : structure de l'époxy-tétraméthylsqualène (en haut) et du diépoxy-tétraméthylsqualène (en bas).

Les époxydes de race L sont également de structure isoprénique. Ils représentent 0,3 %MS de la souche Yamoussoukro (Delahais and Metzger, 1997) (Figure 28).

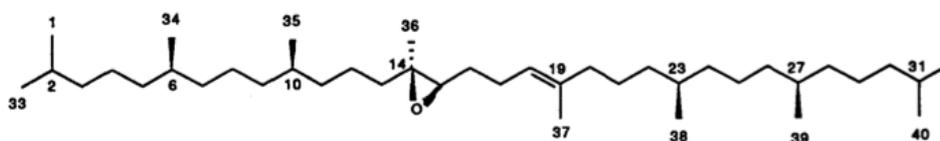


Figure 28 : structure de l'époxyycopaène.

II.2.4 Polymères et macromolécules de l'espèce *B. braunii*

a Polymères polyaldéhydes (A, B, L) : réseau de base de la matrice

Les polyaldéhydes sont présents dans toutes les souches. Ils constituent le tissu de base du polymère de la matrice entourant les cellules de *B. braunii*. Chez les races A et B, ils peuvent représenter 10 %MS (Metzger *et al.*, 1990, 2007). Dans la race L, en général plus abondant, ils peuvent représenter 30 %MS (Derenne *et al.*, 1989). Des études par marquage au ^{14}C ont montré que cette structure polyaldéhydique est formée à partir d'acide oléique (Laureillard *et al.*, 1986; Metzger *et al.*, 1993).

Le polymère de la race A est le plus simple, il est appelé polyaldéhyde aliphatique car il est formé de monomères aldéhydes C_{32} α -branchés et α -insaturés. Son poids moléculaire moyen a été mesuré à $1,4 \cdot 10^5$ Daltons (Figure 29).

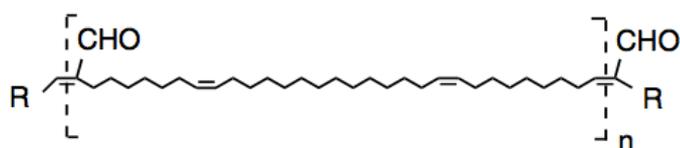


Figure 29 : motif C_{32} du polymère polyaldéhyde

b Polymères polyacétals (B, L)

Les polymères des races B et L ont une structure polyacétals. Ils sont formés à partir de la même structure polyaldéhydique aliphatique que la race A, sur laquelle viennent se greffer, par acétalysation, sur environ sept fonctions aldéhydes sur dix, des terpènes diols, dérivés de terpènes époxydes. Ces dérivés terpéniques sont des polyméthylsqualènes (jamais des botryococcènes) dans la race B, ou des dérivés tétraterpènes dans la race L (Metzger *et al.*, 2007). Certains de ces terpènes portent d'autres fonctions, époxydes notamment, pouvant être reliées à d'autres aldéhydes libres, augmentant ainsi la surface du polymère et/ou sa réticulation (Bertheas *et al.*, 1999). Leur poids moléculaire est plus élevé que celui des polyaldéhydes de race A, entre $2,4$ et $2,7 \cdot 10^5$ Daltons (Figure 30).

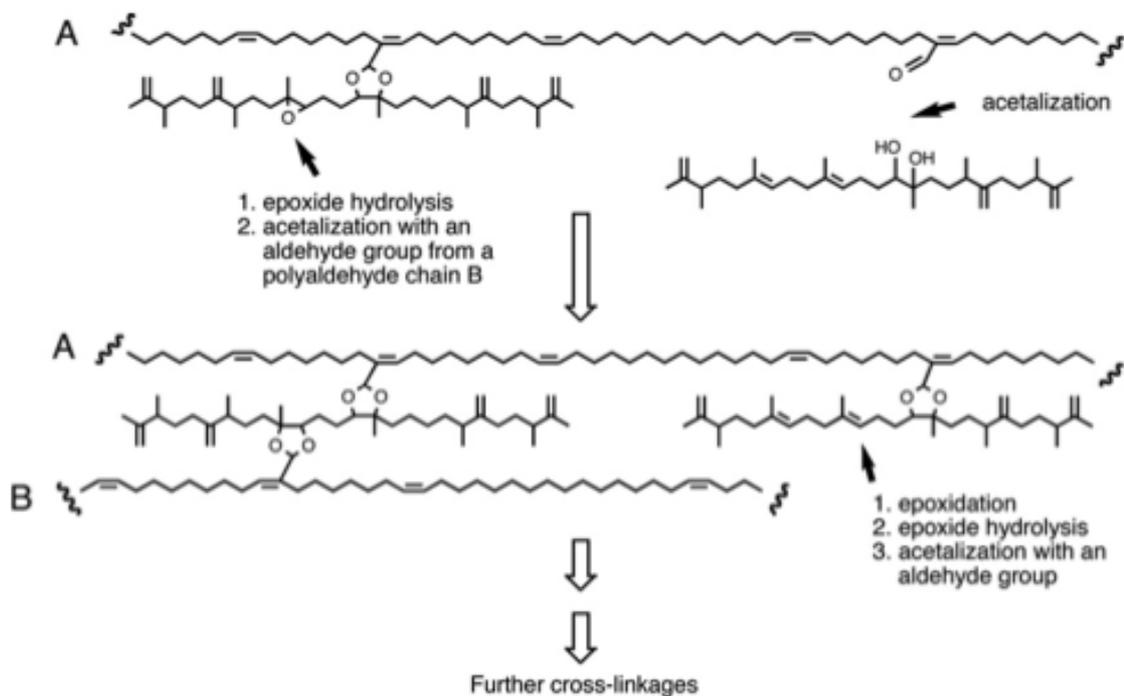


Figure 30 : proposition d'extension du polymère des souches de race B et L, par acétalisation de terpènes diols sur le "tissu" polyaldéhydique (fig.7 dans Metzger 2007).

Les polyacétals, polymères des races B et L, sont solubles dans des solvants peu polaires (chloroforme, THF, heptane) et peuvent être redissous après séchage complet dans ces mêmes solvants (Metzger *et al.*, 2007), ce qui n'est pas le cas du polymère polyaldéhyde de race A, qui aura un aspect de gomme ou de gel translucide dans ces solvants (Metzger *et al.*, 1993).

c Polyéthers (A, B, L) : macromolécules insérées dans le polymère

De nombreux types de lipides éthers ont été identifiés dans des souches de races A, B et L. Ils participent à la complexité/réticulation du polymère de la matrice. Habituellement, les lipides éthers retrouvés dans le monde vivant sont des éthers de glycérol, liant des alcools gras à un glycérol (Metzger and Casadevall, 1991). Dans l'espèce *B. braunii*, la liaison éther relie entre elles de longues chaînes hydrocarbonées. Ils sont résistants aux traitements chimiques drastiques non oxydatifs (Berkaloff *et al.*, 1983). De tels composés résistants reliant des chaînes carbonées par ponts éthers sont décrits dans d'autres groupes d'êtres vivants comme composant de leur cuticule (champignons, autres algues, plantes supérieures).

i. Polyéthers de la race A

Des taux très variables d'alkoxy-éther ont été rapportés dans la race A, de 1 à 30 % de la biomasse sèche (Metzger and Casadevall, 1991; Rager and Metzger, 2000; Villarreal-Rosales *et al.*, 1992). Ils sont formés par un alcadiène ou monoène hydroxylé en C₁₀, relié en C₉ (w₉) à un autre lipide à longue chaîne C₂₄ à C₃₁ (alcène, botryal, alkylphénol) par une liaison éther. L'hydroxyle en C₁₀ peut parfois être estérifié avec un acide gras. Ces lipides seraient formés à partir d'un précurseur époxyde C₉-C₁₀. Des phénoxy-éther ont aussi été identifiés dans la race A, pouvant atteindre 35 % de la biomasse sèche (Metzger, 1994). Ils associent, par une liaison phénoxy, un n-alkenylresorcinol et un alcadiène ou tétraène, botryal ou autre lipide à longue chaîne (Figure 31). D'autres chaînes peuvent être associées par liaison éther de chaque côté du cycle aromatique ou/et sur le ou les alcène(s) associé(s). Là encore, des époxydes seraient précurseurs de ces molécules.

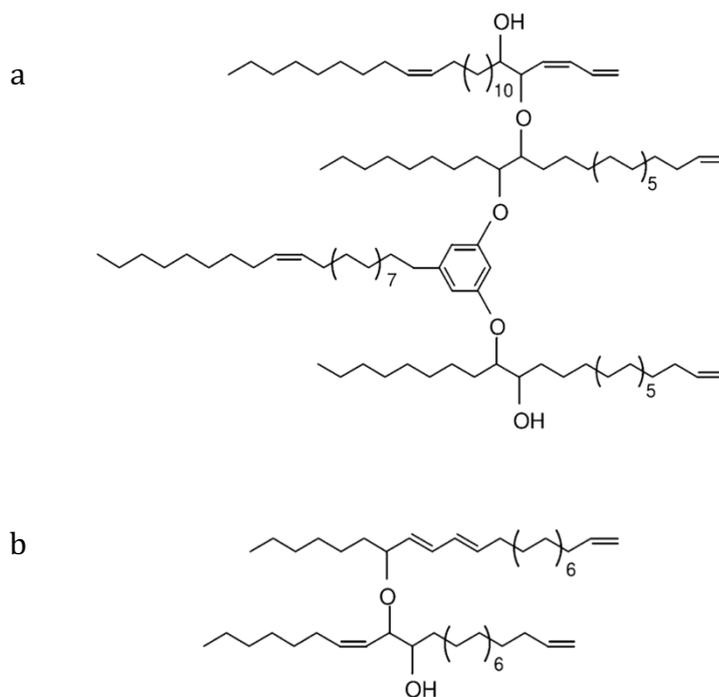


Figure 31 : structure d'un éther lipide résorcinolique (a) et d'un alcadiényl-*O*-altriényl éther (b).

ii. Polyéthers de la race B

Peu de lipides éthers ont été décrits dans la race B. Les braunixanthines sont deux nouveaux caroténoïdes (Okada *et al.*, 1996). Ils relient par liaison éther un échinénone avec un alkyl-phénol et un dérivé tétraméthylsqualène avec une unité tétrahydrofurane (THF). Ils seraient biosynthétisés à partir de dérivés époxydes, comme de nombreux dérivés naturels contenant du THF ou du tétrahydropyrane (THP) (THF acetogénines, THF/THP squalènes) (Rager and Metzger, 2000). D'autres exemples, comme les botryolines, qui est un tétraméthylsqualène replié par trois liaisons éthers intramoléculaires, ont été décrits (Figure 32).

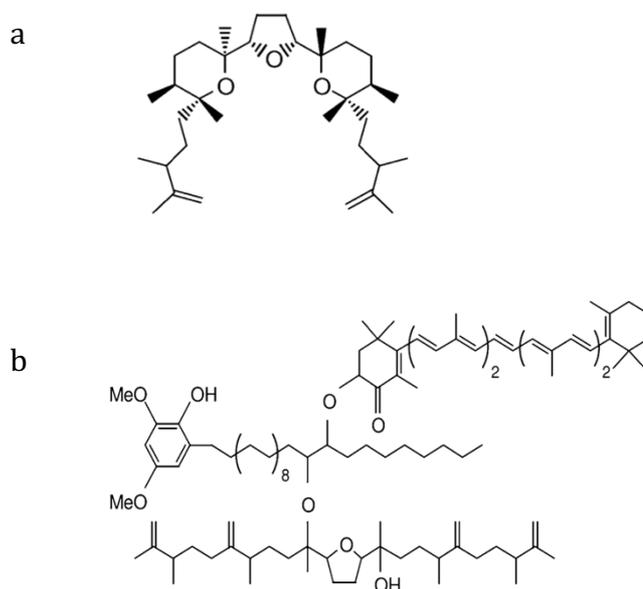


Figure 32 : structure de la botryoline (a) et de la braunixanthine 1 (b).

iii. Polyéthers de la race L

Dans la race L, les polyéthers sont appelés lycopanérois (Figure 33). L'accumulation de lycopadiènes est en général moins élevée que pour les autres races. Une des explications serait leur intégration dans des macromolécules, voire polymères, polyéthers résistant originales, spécifique de la race L. Plusieurs structures ont été décrites. Ces structures relient des chaînes lycopanes (C_{40}), incluant ou non un cycle oxygéné tétrahydrofurane (THF) ou tétrahydropyrane (THP), par des liaisons éthers. Elles peuvent comporter des chaînes n-alkyl, n-alkenyl, des unités n-alkenylphénols, reliées par des liaisons éther ou phénoxy. Toutes ces

chaînes, faisant partie d'une même macromolécule, donnent naissance à des polymères pouvant compter jusqu'à 150 carbones (Metzger and Rager, 2002a; Rager and Metzger, 2000; Metzger *et al.*, 2003).

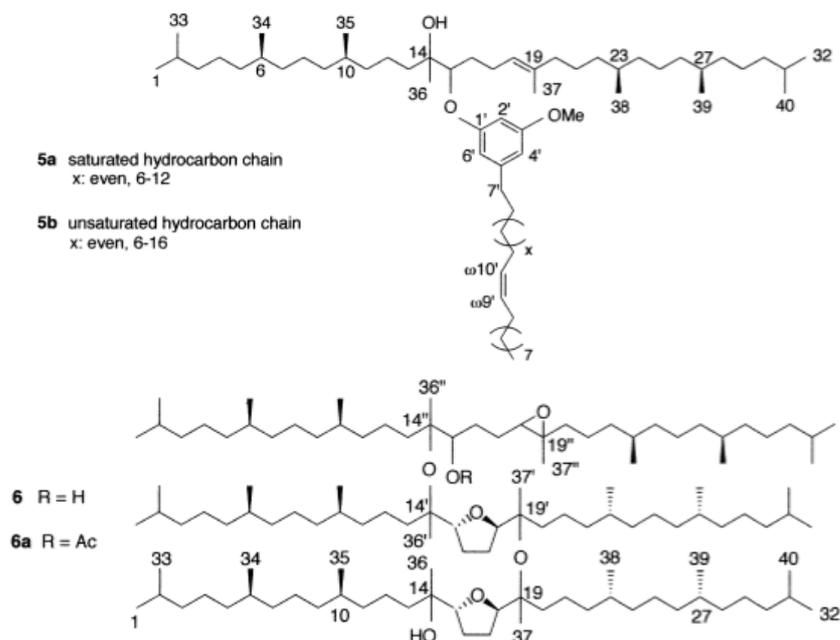


Figure 33 : 4 exemples de lycopanérois, deux lycopanérois I (5a, 5b) et deux lycopanérois J (6a, 6b) (Metzger *et al.*, 2003)

d L'algaenan

La présence d'une paroi trilaminaire externe (TLS) chez les algues, est souvent associée à la présence de polymère résistant de type sporopollénine (Berkaloff *et al.*, 1983). Berkaloff *et al.* (1983) ont montré que le polymère résistant de *B. braunii* partage les mêmes propriétés que les sporopollénines (résistance à la dégradation chimique non-oxydative, mode de déposition sous forme trilaminaire, fluorescence UV). Toutefois, les éléments le constituant sont différents. Ce polymère est de structure originale, tout comme sa quantité dans la biomasse. Ils ont d'abord été baptisés Polymères Résistants de *Botryococcus braunii* (PRB) A pour la race A, PRB B pour la race B. Il fait partie d'une famille de polymères résistants spécifiques des algues, aussi appelée « algaenans », et représente environ 10 % de la biomasse (dans les races A et B) alors que dans d'autres espèces d'algues, il représente moins de 1 % de la biomasse (Kadouri *et al.*, 1988).

Les analyses en spectroscopie Infra-Rouge montrent que chez *B. braunii*, l'algaenan est composé majoritairement d'un réseau polyaldéhydique, entouré d'un environnement

aliphatique (Kadouri *et al.*, 1988) (Figure 34). Les algaenans de *B. braunii* possèdent une structure similaire aux polyaldéhydes aliphatiques. La structure de base de ces polymères est donc un réseau polyaldéhydique aliphatique (Metzger and Largeau, 1999). Des chaînes carbonées sont progressivement greffées à ce polyaldéhyde de base, par l'intermédiaire de liaisons éther (polyéthers, botryals), acétal (polyacétals), ester (acide gras), liaison non covalente (braunicétals), etc. (Metzger and Largeau, 2005b; Metzger *et al.*, 2007; Salmon *et al.*, 2009).

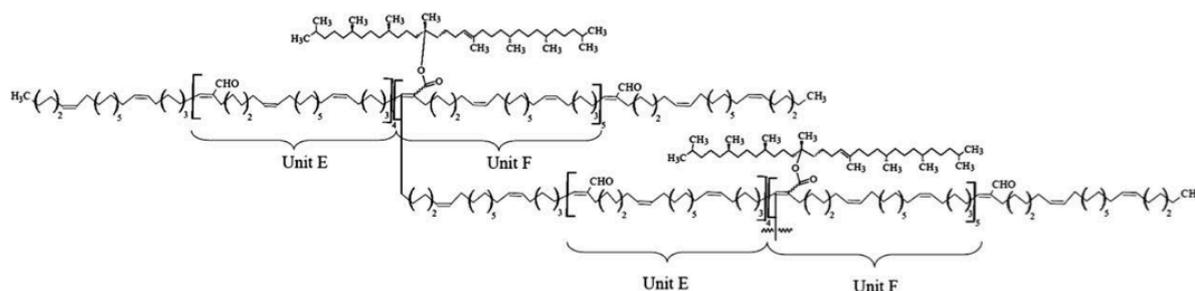


Figure 34 : modèle structural d'un algaenan de race L (Fig. 13 dans Salmon *et al.*, 2009)

La grande réticulation et le caractère aliphatique fort rendent les algaenans insolubles dans les solvants organiques (Metzger *et al.*, 2007). Cela permet également une grande résistance mécanique qui permet de conserver la morphologie des colonies dans les sédiments (Berkaloff *et al.*, 1983) et de conserver les hydrocarbures protégés des dégradations par hydrolyse au cours de la fossilisation, faisant des gisements issus de *B. braunii* des réserves à fort potentiel hydrocarbures.

e Bilan sur les lipides de *B. braunii*

Une présentation simplifiée des principaux lipides de *B. braunii* est présentée dans le Tableau 6. Tous les hydrocarbures, les dérivés lipidiques à longue chaîne (aldéhydes, acétals, époxydes) et les polymères identifiés sont très originaux en comparaison des autres microalgues. De plus les quantités que cette espèce est capable de produire sont très inhabituelles dans le monde vivant. La Figure 35 montre en rouge les familles de lipides que chaque race est capable naturellement d'accumuler. *B. braunii* est donc un microorganisme potentiellement très intéressant pour la production de molécules riches en carbones car elle peut produire des quantités importantes d'HC linéaires ou ramifiés à longue chaîne, et des polymères riches en carbone. Ces caractéristiques chimiques ont orienté naturellement les

chercheurs vers l'étude du potentiel *biocarburant* de la microalgue *B. braunii*. Par conséquent, il est rapide de constater au regard de l'abondante bibliographie relative à cette espèce, que l'étude de l'activité biologique des lipides de cette espèce a toujours été mise de côté. Ce mémoire tente d'établir un panorama des utilisations potentielles de cette microalgue par l'industrie pharmaceutique au sens large.

Tableau 6 : Lipides principaux de *B. braunii* suivant la race de la souche

	Race A	Race B	Race L
Acides gras	5-14%. Acide oléique (C _{18:1}) très majoritaire, acide octacosénoïque (C _{28:1}) souvent abondant		
Stérols	0,1-0,2%. Structures classiques et spécifiques		
Caroténoïdes (couleur des colonies en phase stationnaire)	Jaune ou vert pâle	Jaune, orange, rouge ou brun (accumulation de caroténoïdes, principalement échinénone et canthaxanthine)	
Hydrocarbures majoritaires	n-alcènes C ₂₅ -C ₃₁	Botryococcènes (triterpènes) C ₃₀ -C ₃₇	Lycopadiène (tétraterpènes) C ₄₀
Aldéhydes gras	Botryals	Non détectés	
Acétals gras	Non détectés	Braunicétals	
Epoxydes	Dans toutes les souches		
Alkylphénols	Dans toutes les souches	Dérivés phénoliques peu abondants	
Base du polymère	Polyaldéhyde de même structure pour toutes les races		
Réticulation du polymère par acétalysation (polyacétal)	Non détecté	Acétalysation avec des tétraméthylsqualènes	Acétalysation avec des lycopadiènes
Réticulation du polymère par liaisons éther (polyéthers)	Liaison éther avec des n-alcènes, botryals, alkyl-phénols	Liaison éther avec des polyméthylsqualènes, des alkylphénols, des caroténoïdes.	Liaison éther avec des lycopadiènes, des alkylphénols.

Nous pouvons voir un double intérêt à l'étude de l'application en industrie pharmaceutique d'une fraction de *B. braunii*. D'un côté, *B. braunii* est connue pour produire des molécules originales ; elle est donc une source potentielle pour la découverte de nouvelles molécules à intérêt pharmaceutique, et devrait être étudiée comme telle. D'un autre côté, une utilisation en industrie pharmaceutique ou cosmétique est plus volontiers rémunératrice, notamment en comparaison d'un biocarburant. La production de lipides à haute valeur ajoutée de *B. braunii* pour l'industrie pharmaceutique pourrait donc être réalisée en complément d'une production de biocarburant. Cette complémentarité dans la production et la rentabilité du processus de production constitue le principe de l'approche *bioraffinerie*.

Au regard de la synthèse présentée en début de chapitre sur les lipides d'intérêt pharmaceutique d'origine naturelle, les voies potentielles d'exploitation suivantes existent et pourraient être étudiées.

Vectorisation

Les hydrocarbures à longue chaîne de l'espèce *B. braunii* présentent un potentiel indéniable pour l'industrie pharmaceutique. Grâce à leur longue chaîne hydrocarbonnée, ils possèdent un caractère lipophile fort et au niveau de leurs doubles liaisons, il est possible de leur greffer une molécule d'intérêt, en particulier hydrophile. L'HC ainsi modifié possède, avec un greffon hydrophile, le caractère amphiphile recherché qui permettra à un principe actif d'être transporté jusqu'à son site d'action.

Le squalène, produit en quantité limitée par *B. braunii*, est déjà utilisé pour la vectorisation de principes actifs, notamment des molécules anticancéreuses. Ce procédé de nanomédecine est appelé squalénoylation. Le squalène posséderait l'inocuité et l'efficacité recherchées pour transporter un principe actif jusqu'à son site d'action. Un grand nombre de ces nanotechnologies sont déjà avancées jusqu'au stade d'essai clinique (Caron, 2011).

Les spécialités squalénisées en cours d'essai clinique actuellement présentent néanmoins les inconvénients d'être peu concentrée en PA, d'administration complexe et d'un coût de production assez élevé.

Les HC de *B. braunii* sont de bons candidats pour contourner les inconvénients chimiques (relatifs à la concentration en PA) et biologiques (relatifs à l'administration et à la biodisponibilité). Ainsi, les HC de *B. braunii* possèdent les particularités suivantes, de manière native et qui pourraient être étudiées afin de résoudre les problématiques citées :

- les alcadiènes de la race A sont à chaîne longue et linéaires avec une double liaison terminale permettant la greffe d'une molécule ;
- les botryococcènes présente l'originalité d'avoir une double liaison vinyle au milieu de sa structure triterpénique, ce qui en fait un site idéal pour la greffe d'une molécule conjuguée.

Les mêmes propriétés chimiques permettent d'envisager les HC de *B. braunii* dans la fabrication de liposomes, grâce aux propriétés amphiphiles de ces HC conjugués à une molécule polaire.

De plus, le botryococcène et triterpènes apparentés ont très probablement des propriétés émoullientes similaires au squalène. L'étude de ces molécules dans ce contexte, pour des applications en cosmétique pourrait être envisagée. Le squalène est en effet utilisé en cosmétique comme excipient sous sa forme saturée, le squalane, afin de limiter l'oxydation du produit fini.

Polymères

B. braunii est étudié pour des applications biomatériaux. En effet, elle possède la capacité rare dans le monde vivant de synthétiser des polymères de structures originales et surtout de les accumuler. En cela, *B. braunii* est une espèce d'intérêt majeur pour une production industrielle de biopolymère.

Les polymères de *B. braunii* ont tous une structure de base polyaldéhydique, à base de résidus à 32 carbones et une fonction aldéhyde terminale. Cette fonction chimique permet la greffe de différents composés par liaison éther, acétal ou ester, le plus souvent (Figure 35).

Dans un cadre pharmaceutique, la biocompatibilité de ces polymères mériterait d'être étudiée. Ils pourraient ainsi trouver des applications dans la fabrication de matériel médical invasif ou en contact avec les liquides biologiques.

Activité biologique

L'activité biologique des extraits lipidiques de *B. braunii* sont très peu étudiés. L'activité biologique de ses exopolysaccharides est beaucoup plus souvent étudiée (Buono *et al.*, 2012).

B. braunii possède des lipides classiques à activité antioxydante, les caroténoïdes par exemple. Un extrait des caroténoïdes de *B. braunii* a montré une activité antioxydante très claire (Rao *et al.*, 2007). Les caroténoïdes de race A ont montré une activité antioxydante in vitro et in vivo (Ranga Rao *et al.*, 2010, 2013; Rao *et al.*, 2007). Une fraction ethyl acetate de *B. braunii* aurait également montré une activité bactériostatique sur *Enterobacter aerogenes* (Becker, 2007). Des composés à noyaux resorcinol ont été extraits de *B. braunii* (Metzger, 1994).

Les lipides éthers peuvent également présenter une activité biologique (cytotoxique, indicateurs de neoplasmes, dans l'absorption des graisses). Ils pourraient trouver aussi une application en alimentation animale et humaine.

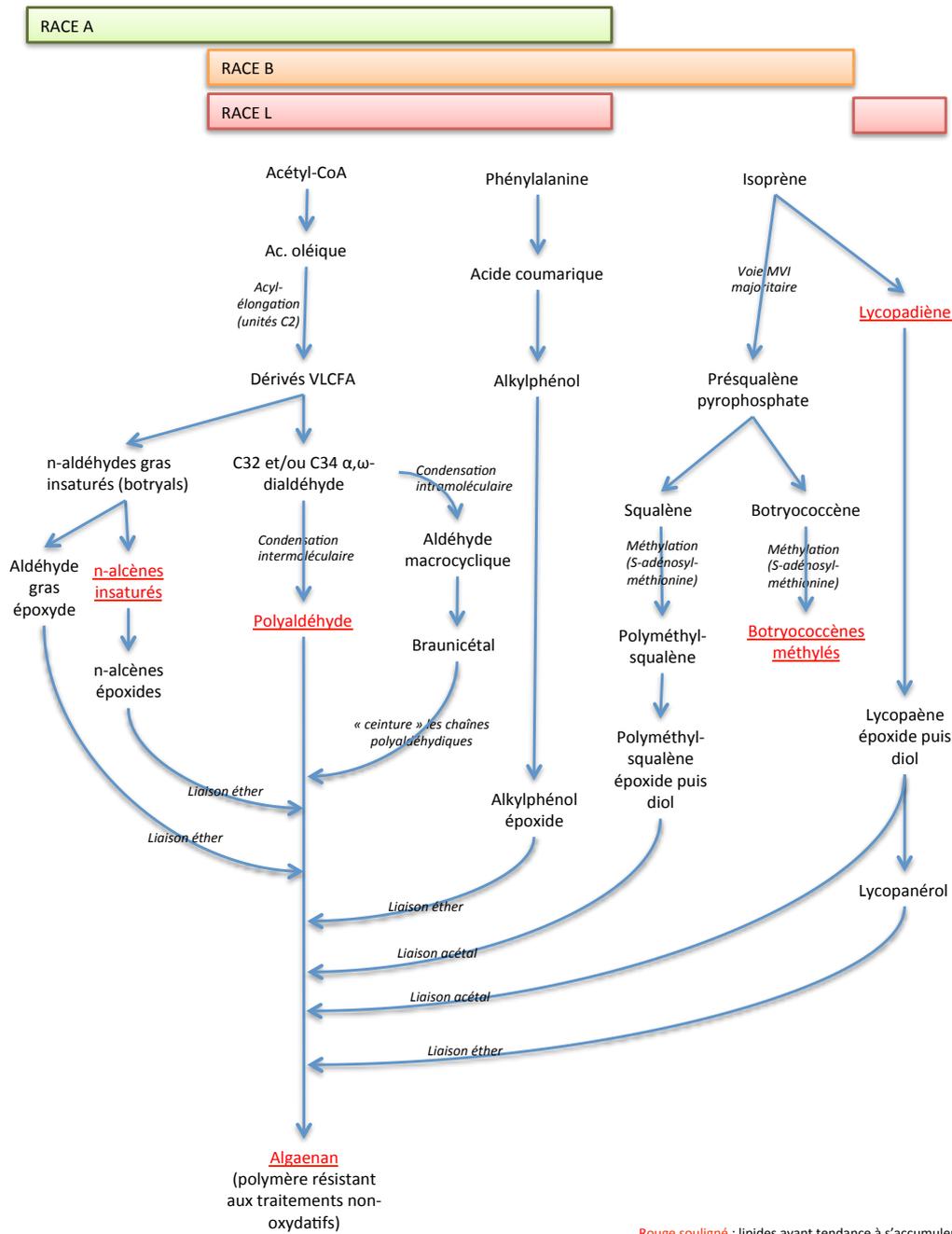


Figure 35 : Schéma du métabolisme des lipides de *B. braunii*, mettant en évidence les voies communes et spécifiques à chaque race. Souligné en rouge, les composés ayant tendance à s'accumuler dans la biomasse et souvent dosés en proportions élevées (>10 %MS).

Chapitre III Culture de la microalgue *B. braunii* en vue d'une production industrielle de ses lipides d'intérêt

B. braunii est connue pour être une microalgue difficile à maîtriser en culture, notamment à cause d'une croissance connue pour être lente. Le défi de la production industrielle d'une microalgue, de *B. braunii* en particulier, réside dans le contrôle de tous les paramètres de culture dans le but d'optimiser la croissance de la microalgue et la production de molécules d'intérêt. Dans le cas présent, c'est la production d'une fraction lipidique riche en hydrocarbures qui nous intéresse. Ce chapitre expose les paramètres de culture à considérer.

III.1 La culture des microalgues en photobioréacteur

III.1.1 Photosynthèse et respiration

a Définition d'un microorganisme photosynthétique

Le terme « microorganisme photosynthétique » comprend les cyanobactéries et les microalgues. Leur nombre est estimé à 100 000 espèces (Sheehan *et al.*, 1998). Les premières sont des organismes procaryotes tandis que les microalgues sont des organismes eucaryotes, ce qui les différencie fondamentalement. En effet, les procaryotes ne sont pas compartimentés au niveau de leur métabolisme énergétique. Ainsi, une cyanobactérie sera capable de réaliser la photosynthèse ou la respiration, elle ne pourra pas réaliser les deux en même temps. La respiration est induite lorsque les conditions d'éclairement sont insuffisantes à la photosynthèse. A l'inverse, les microalgues sont compartimentées et présentent des organites spécifiques où se produisent la photosynthèse et la respiration, à savoir le chloroplaste et la mitochondrie. La prédominance de la photosynthèse ou de la respiration dépendra des conditions de culture et particulièrement du régime d'éclairement. Ces caractéristiques ont une importance primordiale pour la croissance de ces organismes.

La photosynthèse permet aux organismes photosynthétiques d'utiliser la lumière pour produire l'énergie nécessaire aux cellules. Elle a lieu dans les chloroplastes et se décompose en deux types de réactions.

Lors des réactions claires, ou réactions photochimiques, l'énergie lumineuse est transformée en énergie chimique. Celle-ci se traduit par la génération de réducteurs biochimiques, la Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (NADPH) et un composé à la base de l'énergétique cellulaire, l'Adénosine Tri-Phosphate (ATP). L'énergie lumineuse est captée par les pigments et transférée aux photosystèmes. Il existe deux types de photosystèmes, travaillant en série mais à des niveaux différents d'énergie. Le photosystème I (PSI) fonctionne à 700 nm, le photosystème II (PSII) fonctionne à 680 nm. La longueur d'onde indiquée ici correspond au pic d'absorption des pigments qui les composent. Les photosystèmes se situent dans la membrane des thylakoïdes, à l'interface du lumen et du stroma. L'énergie collectée est ensuite transformée en énergie chimique, puis utilisée pour transformer du carbone inorganique (CO₂) en molécules carbonées glucidiques (CH₂O). La photosynthèse peut se résumer à une réaction d'oxydoréduction catalysée par un flux de photons, noté $h\nu$ (III-1).



Lors des réactions sombres (Cycle de Calvin-Benson), le carbone inorganique (CO₂, HCO₃⁻) est fixé par l'utilisation de l'énergie chimique des composés réducteurs générés par les réactions claires. Ces derniers reprennent alors leur forme oxydée (NADP⁺ et l'Adénosine Di-Phosphate (ADP)). La fixation d'une molécule de CO₂ nécessite la consommation de deux molécules de NADPH et de trois molécules d'ATP.

La conversion du CO₂ en sucres et autres métabolites a lieu en quatre phases distinctes, formant le cycle de Calvin-Benson (Masojídek *et al.*, 2013):

- la phase de carboxylation (ou de fixation du carbone) où le CO₂ est fixé au ribulose bisphosphate (Ribulose-bis-P), un sucre à 5 carbones (C₅), pour former deux

molécules de 3-phosphoglycérate (3GP). Cette réaction est catalysée par la ribulose 1,5 biphosphate carboxylas/oxygénase (Rubisco). Le 3GP est le point de départ du métabolisme des lipides et des acides aminés.

- La phase de réduction, où le 3GP est converti en hexose phosphate (hexose-P). Cette réaction nécessite l'énergie d'un ATP et d'un NADPH.
- La phase de régénération permettant de régénérer le stock de Ribulose-bis-P par l'intermédiaire d'une série de réactions combinant des sucres phosphates C₃, C₄, C₅, C₆ et C₇. Cette phase consomme l'énergie d'un ATP.
- La phase de production du cycle de Calvin-Benson concerne la production de produits finaux de la photosynthèse, carbohydrates, lipides acides aminés et acides organiques.

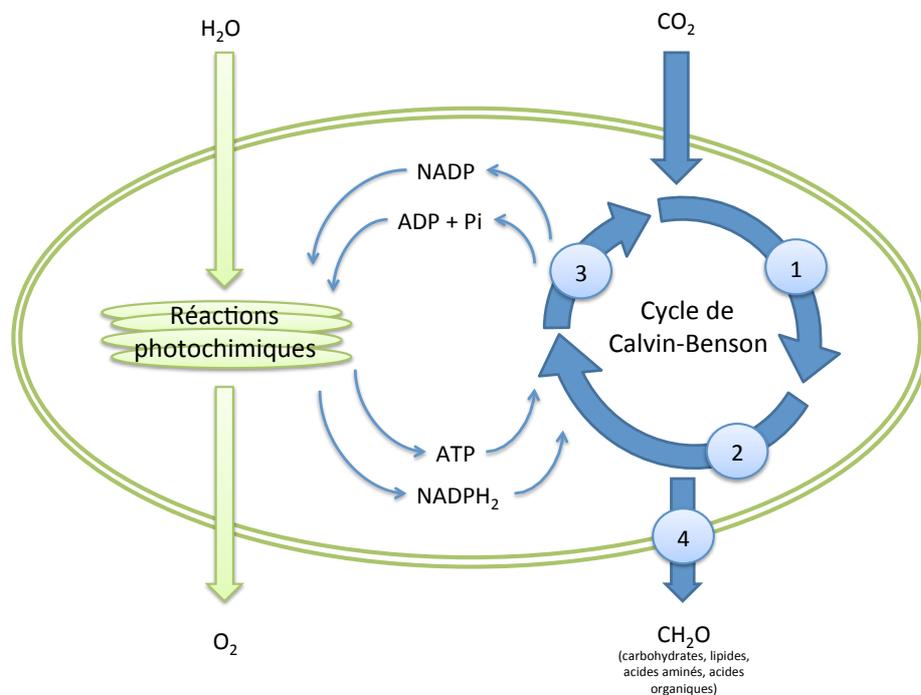


Figure 36 : Schéma de la photosynthèse avec les réactions photochimiques (réactions claires) et le cycle de Calvin-Benson (réactions sombres) permettant de fixer le carbone inorganique à travers 4 phases successives : (1) phase de carboxylation, (2) phase de réduction, (3) phase de régénération et (4) phase de production.

La respiration consomme du dioxygène (O_2) et produit du dioxyde de carbone (CO_2). C'est un processus qui rentre en compétition avec la carboxylation, sans aucun gain métabolique (Masojídek *et al.*, 2013). Elle a longtemps été considérée comme un processus de gaspillage chez les cellules photosynthétiques mais elle est de plus en plus considérée comme une composante clé de la photosynthèse et du cycle du carbone. Elle a lieu chez les microalgues dans la mitochondrie, organite intracellulaire.

L'activité respiratoire dépend des concentrations relatives en CO_2 et O_2 . Lorsque le rapport O_2/CO_2 est élevé, l'activité oxygénase de la Rubisco est stimulée. De plus, l'enzyme a une faible affinité pour le CO_2 . Ainsi, lorsque le niveau d'oxygène est élevé, le niveau de CO_2 faible et également sous une irradiance forte, l'équilibre est déplacé vers la respiration (Masojídek *et al.*, 2013). En cours de culture, différentes solutions existent afin de minimiser les effets de la respiration. Le ratio CO_2/O_2 peut être augmenté à des niveaux beaucoup plus élevés que dans l'air, pour améliorer l'activité carboxylase de la Rubisco, soit en extrayant efficacement l'oxygène d'une culture, soit en augmentant la présence du CO_2 dans l'air bullé dans la culture.

III.1.2 Besoins nutritifs et paramètres physiques de culture

a Le carbone

En autotrophie, les organismes photosynthétiques assimilent le carbone inorganique comme seule source carbonée. De plus, l'analyse élémentaire de microalgues montre que le carbone est l'élément principal de la biomasse (45 à 50 %MS) (Tableau 7). La source de carbone est donc le nutriment majoritaire lors de la croissance. En autotrophie, la synthèse d'1g de biomasse nécessite ainsi théoriquement entre 1,65 et 1,83g de CO_2 .

Tableau 7 : composition massique (%) de différentes souches de microorganismes photosynthétiques (source GEPEA)

	C	H	O	N	P	S	TOTAL
<i>Chlorella vulgaris</i>	47,98%	7,03%	23,39%	8,87%	0,94%	0,82%	96,15%
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	47,07%	6,99%	27,45%	9,67%	2,21%	0,83%	94,22%

La cellule est capable d'utiliser les deux formes majoritaires de carbone inorganique présentes en général dans son environnement, CO_2 et HCO_3^- , à l'aide de transporteurs transmembranaires. Le carbone inorganique étant assimilé dans le chloroplaste, il doit traverser à la fois la membrane plasmique et l'enveloppe chloroplastique. Seul le CO_2 est a priori capable de diffuser suivant un gradient de concentration. La microalgue possède probablement plusieurs transporteurs ou complexes de transport au travers de chaque membrane, permettant de transporter le carbone depuis le milieu externe directement jusqu'à la Rubisco (Le Gouic, 2013). Le transfert gaz/liquide de CO_2 entre le milieu aqueux et l'atmosphère étant relativement lent, et l'affinité de la Rubisco pour le CO_2 étant très faible, des mécanismes de concentration du carbone (MCC) existent chez la plupart des microalgues (Kaplan and Reinhold, 1999).

b L'Azote

L'azote est un des éléments les plus abondants dans la biomasse. Il est compris entre 1 et 10 %MS. Ce taux varie énormément d'un groupe d'algues à un autre mais aussi au sein d'une même espèce, dépendant alors de la concentration disponible dans le milieu. La réponse typique à une limitation en azote est une décoloration de la biomasse (baisse des chlorophylles et augmentation des caroténoïdes) et une accumulation de composés organiques, tels que des polysaccharides et certains lipides (triglycérides en particulier) (Becker, 1994; Pruvost *et al.*, 2009; Van Vooren *et al.*, 2012).

L'azote est en général apporté sous forme de nitrates (NO_3^-), mais aussi sous forme d'ammonium (NH_4^+) ou d'urée. Le choix de leur concentration dans le milieu de culture est d'une grande importance. Ainsi, une concentration limitante en azote peut permettre par limitation des mécanismes de division cellulaire d'augmenter la production en pigments, en carbohydrates, en lipides.

c Le phosphore

Le phosphore est essentiel pour la croissance et de nombreuses réactions cellulaires, notamment le transfert d'énergie, la biosynthèse d'acides nucléiques, etc. La biomasse en contient en général moins de 1 %MS. Il est introduit préférentiellement dans le milieu de culture sous forme d'orthophosphate (PO_4^{2-}). Il est souvent limitant pour la croissance car il se retrouve aisément lié à d'autres ions (CO_3^{2-} , fer), provoquant sa précipitation et le rendant indisponible pour la biomasse. Les algues sont souvent capables de stocker le phosphore en excès dans la cellule, sous forme d'inclusions polyphosphates. Celles-ci peuvent ensuite être remobilisées quand la concentration extracellulaire est trop faible.

L'apport de phosphore influence également la composition de la biomasse produite. Les lipides et les carbohydrates sont particulièrement impactés par l'apport interne et externe en phosphore (Borowitzka, 1988).

d Autres micronutriments et macronutriments, et chélatants

Environ 30 composés inorganiques peuvent être utilisés par les algues pour leur croissance (Grobbelaar, 2013). Outre C, N et P, les éléments S, K, Fe, Mg, Ca et les éléments traces tels que B, Cu, Mn, Zn, Mo, Co, V et Se ont une importance primordiale. Beaucoup d'éléments trace sont importants dans les réactions enzymatiques et pour la biosynthèse de nombreux composés.

Il faut veiller à ce qu'ils ne soient pas rendus indisponibles, notamment par précipitation avec les phosphates. L'addition d'un agent chélatant tel que l'EDTA permet de résoudre ce problème. L'acide citrique est également utilisé pour le même usage dans certains milieux.

i. Réponse biochimique

La lumière a une grande influence sur le contenu biochimique de la cellule. Au niveau pigmentaire, une baisse de l'intensité lumineuse provoque l'augmentation du contenu en chlorophylle et autres pigments utiles à l'absorption de lumière. Une réorganisation pigmentaire peut aussi avoir lieu. Ainsi, lorsque l'intensité lumineuse est élevée, la proportion par rapport à la chlorophylle en caroténoïdes secondaires, agents photoprotecteurs, augmente (β -carotène, lutéine, astaxanthine, etc). Le profil pigmentaire est ainsi souvent utilisé comme indicateur de stress lumineux.

Une forte lumière reçue a tendance, chez certaines espèces à provoquer également une augmentation de la production de métabolites secondaires comme les polysaccharides. Par exemple, lorsque l'intensité est augmentée de 75 à 300 $\mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, le taux de polysaccharides de *Porphyridium* sp. peut augmenter d'un facteur 3 (Friedman *et al.*, 1991). De même, de nombreuses études montrent que le contenu en lipides augmente avec l'intensité lumineuse reçue. Ces lipides sont présents en général sous forme de triacylglycérols (TAG) (Hu *et al.*, 2008).

ii. Réponse photosynthétique

Les réactions photosynthétiques sont fortement dépendantes de l'énergie lumineuse captée. L'évolution du taux de croissance avec l'augmentation de la densité de flux peut être mise en évidence par la mesure du dégagement de dioxygène (J_{O_2}) (Richmond and Hu, 2013). Trois zones de fonctionnement du mécanisme photosynthétique sont ainsi identifiées, exprimée en fonction de la lumière reçue (irradiance, G) (Figure 37) :

- La cellule ne reçoit pas suffisamment de photons, ce qui permet à la respiration d'être prédominante ($J_{O_2} < 0$). La valeur limite peut être représentée par G_c , l'irradiance de compensation, valeur à partir de laquelle les réactions photosynthétiques deviennent majoritaires sur la respiration. Par exemple pour *Chlamydomonas reinhardtii*, la valeur de G_c est proche de 10 $\mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Takache, 2010).

- Pour des valeurs supérieures d'éclairement, la croissance est dite photolimitée. Le taux de croissance (donc le taux de dégagement de dioxygène) croît ($J_{O_2} > 0$) jusqu'à une valeur maximale. Cette valeur maximale est souvent associée à une irradiance de saturation, notée G_s .
- Pour des éclaircements très forts ($G > G_s$), la cellule entre en photoinhibition. Sa croissance diminue progressivement avec l'irradiance. Dans cette phase, de nombreux phénomènes métaboliques interviennent et on observe notamment la concentration en caroténoïdes de protection qui augmente et celle des chlorophylles qui diminue.

iii. Atténuation de la lumière

Dans le cadre d'une culture de microorganismes photosynthétiques, il faut distinguer l'énergie captée en surface de culture caractérisée usuellement par le terme PFD (pour Photon Flux Density et notée q_0), de l'énergie disponible dans le volume de culture. La lumière subit en effet une atténuation avec la profondeur de culture. Cette atténuation est fonction principalement de la concentration de biomasse dans la culture.

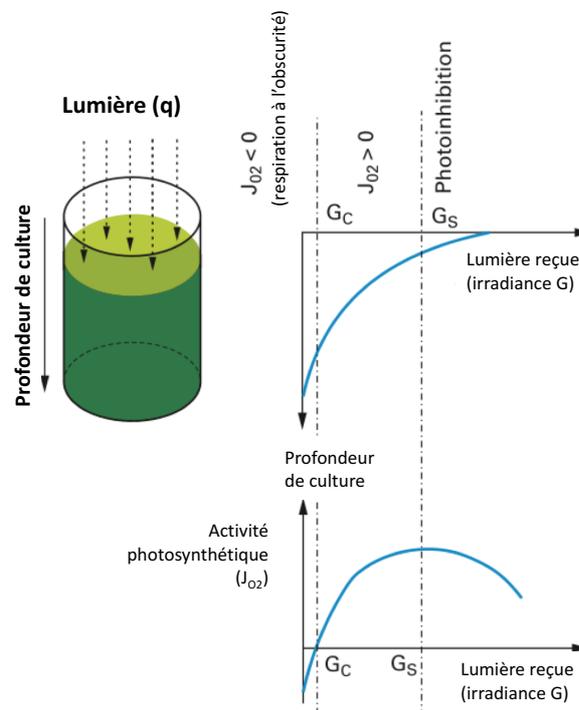


Figure 37 : Relation entre l'atténuation de la lumière reçue (G), la croissance photosynthétique (J_{O_2}) et la profondeur de la culture.

Il est donc possible de définir une fraction éclairée γ liée à la profondeur nécessaire à l'extinction totale du flux lumineux incident. C'est le rapport entre la profondeur de la zone éclairée de la culture (profondeur recevant une irradiance supérieure à G_c) et la profondeur totale de la culture. Ce rapport γ permet de définir trois régimes de fonctionnement d'un photobioréacteur (PBR) en mode continu :

- $\gamma < 1$; il existe une zone sombre entraînant une perte de productivité chez une microalgue car la respiration y est prédominante (pas de perte de productivité chez une cyanobactérie). Toute la lumière reçue est donc absorbée. La culture est dite en régime de limitation physique.
- $\gamma = 1$; toute la lumière est absorbée par la culture, mais il n'existe pas de zone sombre. Les conditions de croissance sont alors optimales. La productivité est maximale pour l'intensité lumineuse reçue. La culture est dite en régime luminostat.
- $\gamma > 1$; la biomasse est en concentration trop faible pour absorber tout le flux de photons incidents, et une partie de cette lumière est transmise à travers le réacteur. Il y a donc une perte d'efficacité énergétique du procédé de culture puisque toute l'énergie lumineuse reçue n'est pas utilisée. La culture est dite en régime cinétique.

La Figure 38 donne une représentation de ces différents régimes pour un PBR opéré en continu. Dans ce cas, la concentration en biomasse dans le réacteur est ajustée grâce au temps de séjour τ appliqué dans les systèmes de culture. Les conditions d'atténuation de lumière sont impactées, avec un effet direct sur la productivité en biomasse obtenue. Celle-ci est maximale en régime luminostat (b).

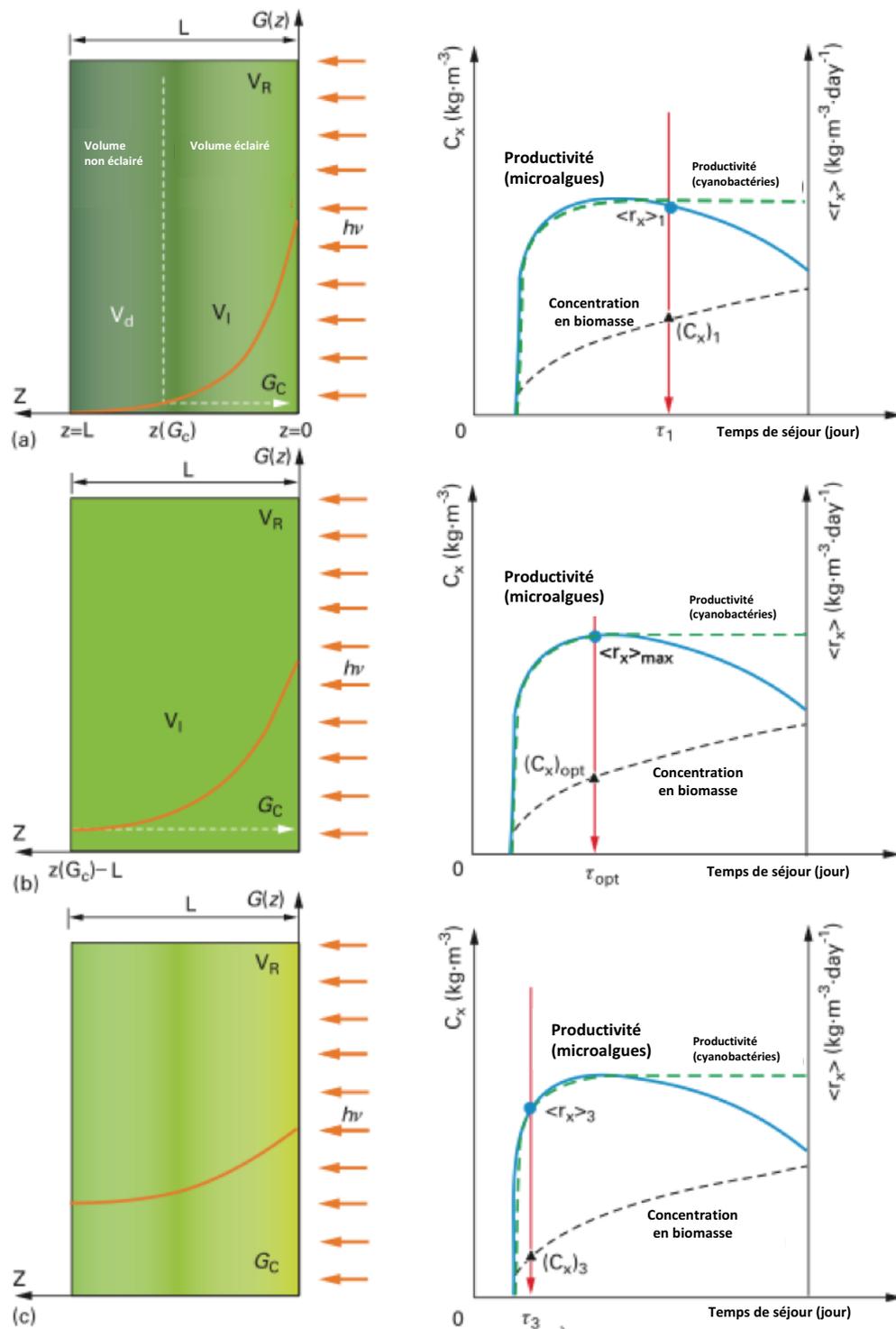


Figure 38 : relation entre la lumière absorbée en fonction de la profondeur de culture ($G(z)$), la concentration en biomasse dans le réacteur (C_x) et la productivité volumique ($\langle r_x \rangle$). Illustration des trois régimes de fonctionnement d'un PBR : photolimitation (a), luminostat (b), cinétique (c). (Pruvost and Cornet, 2012)

La valeur de pH du milieu joue un rôle prépondérant sur la concentration en carbone inorganique dissous (CID) dans le milieu (Figure 39). Elle fixe le pool de CID atteignable à l'équilibre mais également la répartition des différentes espèces carbonatées (CO_2 , HCO_3^- , CO_3^{2-}). Or la croissance des microorganismes photosynthétiques est optimale à des valeurs de pH données, imposées par l'espèce cultivée. De manière générale, il est possible de trouver des espèces de microorganismes photosynthétiques se développant à des pH allant de 6 à 10. En dehors des espèces extrémophiles, la majorité d'entre eux ont un pH optimal de croissance situé aux alentours de 7.5 pour les microorganismes d'eau douce, et 8,3 pour ceux d'eau de mer (Le Gouic, 2013).

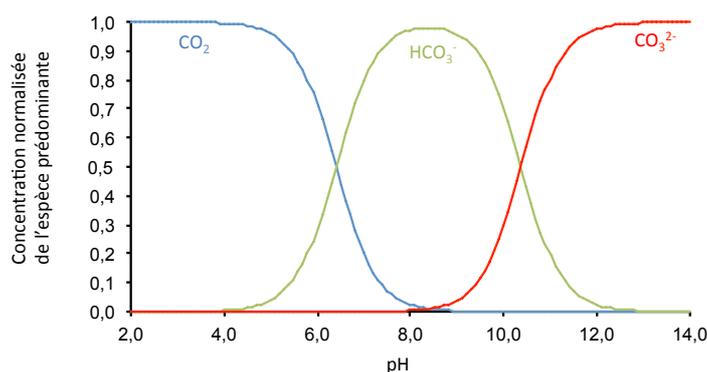


Figure 39 : Répartition des différentes espèces carbonatées en fonction du pH à une température de 20°C et une force ionique nulle.

Afin de travailler dans des conditions de croissance optimale, aucun nutriment minéral ne doit être limitant. Il est par conséquent nécessaire d'assurer une valeur de CID suffisante aux microorganismes photosynthétiques pour leur assurer une croissance optimale tout en respectant le domaine de pH toléré par chaque espèce (dépendant des caractéristiques physiologiques du microorganisme étudié).

La température a un impact sur la croissance et la composition biochimique de la biomasse. Par exemple, une température sous-optimale provoque en général une baisse du contenu en lipides totaux (LT) mais augmente la proportion de lipides insaturés dans les membranes. Ce phénomène permet de préserver leur bon fonctionnement en augmentant leur stabilité et leur fluidité, en particulier au niveau des thylakoïdes. Le contenu pigmentaire est également souvent modifié sous l'effet de la température. En général, le contenu en chlorophylle a et en caroténoïdes totaux augmente quand la température augmente (Liu and Lee, 2000; Thompson *et al.*, 1992). Des températures plus élevées peuvent induire la formation de radicaux oxygénés dans les cellules algales, stress oxydatif qui peut provoquer la caroténogénèse voire la mort de la cellule (Borowitzka, 1988).

III.1.3 Systèmes de culture

Il n'existe pas de technologie type pour la culture des algues. Suivant le microorganisme cultivé, la lumière utilisée, le procédé de récolte, etc, le système de culture doit être adapté. Différents systèmes de culture existent, de différents volumes et différentes géométries (Tableau 8). On distinguera notamment les systèmes à usage industriel où l'objectif est souvent économique de ceux des laboratoires. Pour l'étude en laboratoire d'une microalgue, il est nécessaire de réaliser des cultures contrôlées. Ainsi, le PBR utilisé devra permettre de connaître et d'ajuster les paramètres chimiques, physiques et biologiques de culture. Pour cela, il faut également que les nutriments et les cellules soient mélangés de manière homogène dans le PBR. La conception des PBR en fonction de tous ces paramètres est primordiale pour l'étude d'une microalgue.

i. Systèmes ouverts

Les systèmes de culture sont dits ouverts lorsqu'il n'y a pas de séparation physique entre la culture et l'environnement extérieur. Dans ces systèmes, le contrôle de la culture (pH, température en particulier) est techniquement difficile. L'évaporation du milieu n'est pas contrôlée et la culture est exposée aux contaminations extérieures.

La surface spécifique a_s (rapport entre surface et volume de culture) de tels systèmes est inférieure à 20 m^{-1} (épaisseur de culture supérieure à 5 cm), menant à de faibles productivités. Cela est compensé usuellement par une augmentation de la taille de ces technologies. Les volumes mis en jeu dans ce type de systèmes sont alors souvent de plusieurs mètres cubes, et les surfaces peuvent aller jusqu'à plusieurs hectares.

Etant donnée l'absence quasi-totale de contrôle sur ces systèmes, leur utilisation est limitée à la production de souches robustes (*Chlorella vulgaris*) voire extrémophiles (*Dunaliella salina*). La grande majorité de ces systèmes utilisent l'énergie solaire du fait de leur grande surface (Figure 40).



(a) lagunes utilisées pour la culture de *Dunaliella salina* par Cognis Nutrition and Health en Australie.



(b) raceways utilisés pour la culture de *Spirulina platensis* par Earthrise en Californie

Figure 40 : Exemples de systèmes de culture ouverts

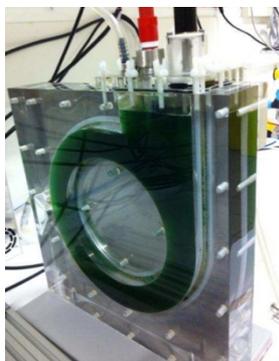
ii. Systèmes clos

Les systèmes clos permettent d'isoler la culture de l'environnement extérieur. Toute entrée ou sortie peut être de plus stérilisée de manière à garder la culture axénique.

Le développement de ce type de réacteur présente un grand potentiel par rapport aux technologies ouvertes. En effet, ils offrent plus de possibilités quant aux éléments de conception (géométrie, matériaux...) et les surfaces spécifiques peuvent être largement augmentées par réduction des épaisseurs de culture, maîtrise de l'apport de lumière et contrôle de l'évaporation du milieu. Cependant, les coûts de production augmentent fortement avec le

niveau de technologie du procédé mis en œuvre. Les cultures de microorganismes photosynthétiques dans les PBR clos sont donc actuellement orientées majoritairement vers la production de molécules à haute valeur ajoutée. Dans le cadre de la production de biocarburants, l'intérêt des systèmes clos réside dans le contrôle fin des conditions de culture nécessaire à l'expression notamment des lipides (carence azotée par exemple), dans la possibilité d'intensifier les performances tout en maîtrisant les intrants-sortants, et dans la possibilité de cultiver un nombre élargi de souches.

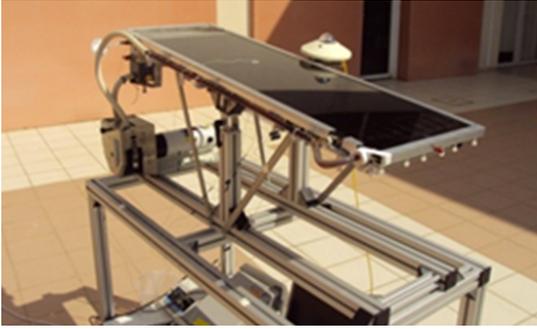
Du fait des coûts de réalisation en général plus élevés et des contraintes technologiques induites par l'utilisation de systèmes clos (tenue à la pression hydrostatique notamment), les volumes de culture rencontrés dans les PBR clos sont en général plus faibles que dans les systèmes ouverts, bien qu'ils puissent atteindre plusieurs centaines de mètres cubes. Cependant, leur plus faible contenance est partiellement compensée par l'intensification des productivités possibles dans ces systèmes. Pruvost et Cornet (2012) ont ainsi montré que la productivité volumique pouvait être augmentée de deux ordres de grandeur par rapport aux systèmes ouverts, par mise en place de PBR en couche mince de type algofilm (Figure 41-c). Ils ont également montré que ces technologies fermées permettaient d'atteindre les maxima de conversion solaire par la photosynthèse (tout organisme vivant confondu). Ces auteurs ont ainsi défini les limites de production sur Terre. Pour des technologies à éclairage en surface (dits à captation directe) comme algofilm, la productivité maximale en biomasse est ainsi de l'ordre de $100 \text{ tonnes} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{an}^{-1}$ (Figure 42). Pour des technologies plus évoluées permettant une captation du flux solaire séparée par un apport optimisé dans le volume de culture (technologie type DiCoFluV, Cornet, 2010), cette productivité peut être augmentée d'un facteur 2 à 3.



(a) PBR torique (GEPEA)



(b) PBR airlift plan (GEPEA)



(c) PBR à film tombant, technologie Algofilm
(GEPEA)



(d) PBR tubulaire (IGV)



(e) PBR à éclairage volumique “DiCoFluV” (dilution contrôlée du flux en volume) (Institut Pascal de Clermont-Ferrand)

Figure 41 : Exemples de systèmes de culture clos

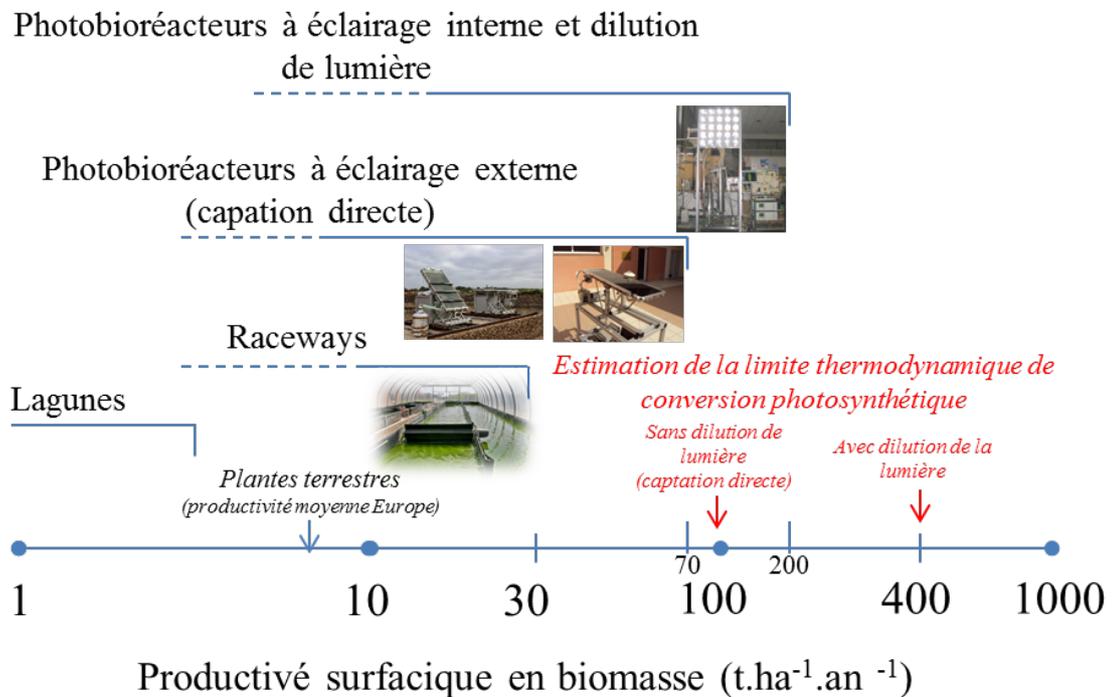
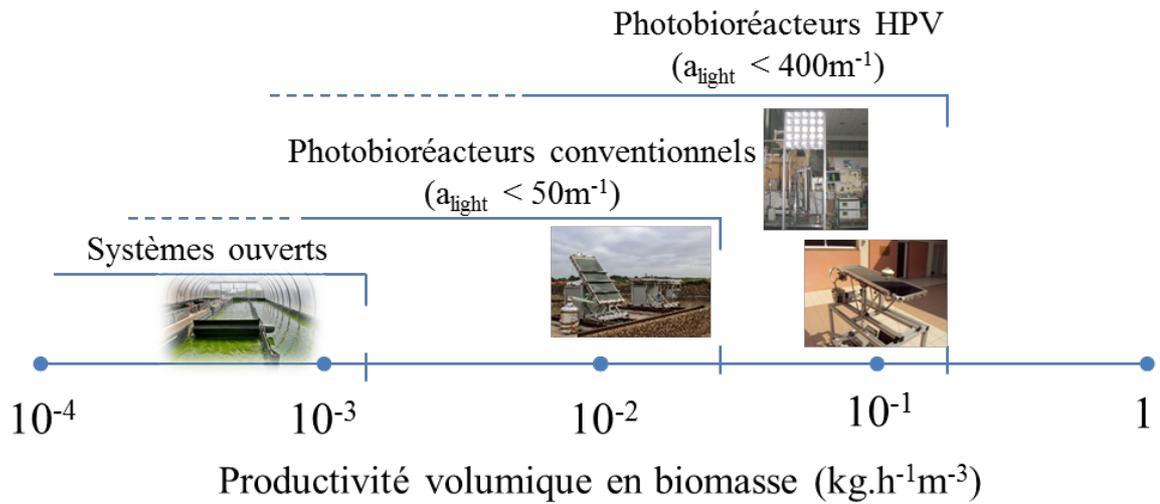


Figure 42 : ordres de grandeur des productivités volumiques et surfaciques en biomasse ($\text{t}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{an}^{-1}$) pour différentes technologies de réacteurs.

Type de PBR	Caractéristiques générales	Type de système	Type d'éclairage	Volume réactionnel (m ³)	Surface spécifique éclairée (m ⁻¹)	Productivité vol. théo. max. (kg _x .m ⁻³ .j ⁻¹)**	Exemples d'utilisation
Cylindrique	Horizontal	Clos	Solaire et/ou artificiel	0.1 à 700			Molina <i>et al.</i> 2001
	Incliné	Clos	Solaire et/ou artificiel	0.1 à >100	<10 – 200	<0.21 – 4.25	Lee <i>et al.</i> 1995
		Clos	Solaire et/ou artificiel	0.01 à >100			Jacob-Lopes <i>et al.</i> 2007
	Vertical	Clos	Artificiel	<0.01			Watanabe <i>et al.</i> 1996
Annulaire	Diminution des pertes de lumière, maintenance difficile	Clos	Artificiel	<1	<50	<1.06	Pruvost 2000
DiCoFLuV	Fonctionnement au maximum théorique du rendement thermo. photosynthétique, maintenance difficile	Clos	Solaire et/ou artificiel	0.08	>400	>8.49	Comet 2010
Plan	Lagunes	Ouvert	Solaire	0.1 à >100	<5	<0.11	
	Raceway	Ouvert ou Clos	Solaire et/ou artificiel	0.1 à >100	<10	<0.21	Ugwu <i>et al.</i> 2008
	Film tombant	Ouvert ou Clos	Solaire et/ou artificiel	0.635-400	100 - 500	2.13 – 10.6	Doucha Livansky 1999, Pruvost <i>et al.</i> 2010
	Airlift plan	Clos	Solaire et/ou artificiel	10 ⁻⁶ à >100	<50 ou >200*	<1.06 ou >4.25*	Richmond et Cheng-Wu2001, Zhang <i>et al.</i> 2001
	Torique	Non extrapolable, contrôle parfait de la culture, idéal pour les études en laboratoire	Clos	Solaire et/ou artificiel	1.5*10 ⁻³	25	0.53
Gaine plastique	Culture discontinue uniquement, peu de contrôle	Clos	Solaire et/ou artificiel	≈0.1	≈10	≈0.21	Moheimani 2013

* Dans le cas des PBR intensifs, les épaisseurs de culture sont de l'ordre de quelques mm, donc les surfaces spécifiques rencontrées sont beaucoup plus importantes.

** Les productivités annoncées ont été calculées à partir du modèle développé par Comet *et al.* (2009) pour un éclairage de 270 μmol.m⁻².s⁻¹, correspondant à la moyenne solaire annuelle reçue à Saint-Nazaire, pour le microorganisme eucaryote *Chlamydomonas reinhardtii* en production autotrophique

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des principales technologies de systèmes de culture et leurs données essentielles (Souliès, 2014)

III.1.4 Modes de culture

a Mode discontinu

Ce mode de culture, aussi appelé « batch », est le plus utilisé en laboratoire car il ne requiert pas de suivi ou de contrôle particulier (Richmond and Hu, 2013). Les cellules sont inoculées dans un volume fixe de milieu avec une certaine quantité de nutriments minéraux qui sera consommée tout au long de la croissance cellulaire. La croissance en mode discontinu est caractérisée par plusieurs phases successives (Figure 43) (Herbland, 2007) :

- Phase de latence, pendant laquelle la croissance est très lente
- Phase exponentielle, pendant laquelle la croissance atteint un maximum et l'augmentation de la concentration en biomasse (C_x) par unité de temps est proportionnelle à la concentration présente à l'instant t
- Phase stationnaire, dès lors qu'un élément nutritif devient limitant. La concentration en biomasse n'augmente plus
- Phase de déclin, caractérisée par une mort cellulaire.

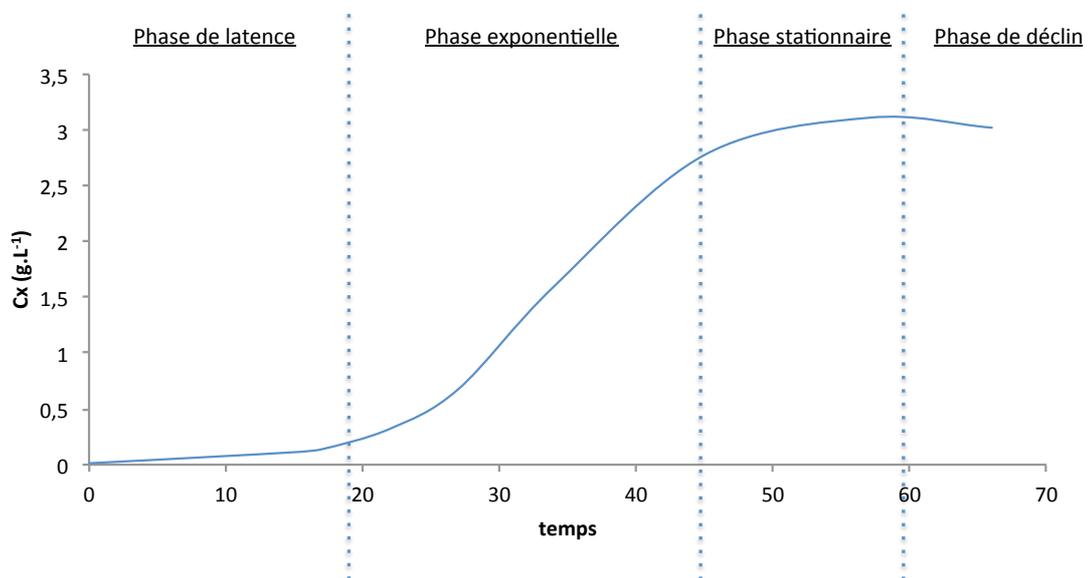


Figure 43 : évolution typique de la concentration en biomasse C_x d'une culture batch, en fonction du temps et mise en évidence des quatre principales phases de croissance.

La vitesse de croissance est usuellement représentée par le taux de croissance μ , qui est la vitesse de croissance (r_x) ramenée par unité de biomasse (équation (III-2)). Le taux de croissance est souvent utilisé pour en déduire un nombre de doublements par unité de temps ou un temps de doublement t_d (formule (III-3)).

$$\mu = \frac{1}{Cx} \cdot \frac{dCx}{dt} = \frac{1}{Cx} \cdot r_x = \ln \frac{Cx_t}{Cx_{t_0}} \cdot \frac{1}{(t - t_0)} \quad (\text{III-2})$$

μ : taux de croissance instantané (j^{-1})

r_x : vitesse de croissance ($g.L^{-1}.j^{-1}$)

\ln : logarithme népérien

Cx_t : concentration en biomasse au temps $t > t_0$ ($g.L^{-1}$)

Cx_{t_0} : concentration en biomasse au temps t_0 ($g.L^{-1}$)

$$\mu_d = \frac{1}{t_d} = \frac{\mu}{\ln 2} = \frac{\mu}{0,693} \quad (\text{III-3})$$

μ_d : taux de croissance exprimé en nombre de doublements (par jour)

t_d : temps de doublement (en jour)

μ : taux de croissance instantané (j^{-1})

\ln : logarithme népérien

Dans le cas des cultures de microalgues, les phases de croissance en batch sont liées à l'évolution de l'atténuation de lumière avec la concentration en biomasse. Pour une densité de flux incident constante, dans le cas d'une culture discontinue, la fraction éclairée va progressivement diminuer car la concentration en biomasse augmente, conduisant à l'apparition d'une zone sombre grandissante dans le réacteur. Pour une microalgue, la vitesse de croissance est maximale ($\langle r_{x_{max}} \rangle$) lorsque $\gamma=1$. Ensuite, $\langle r_x \rangle$ diminue progressivement avec l'apparition de la zone sombre car la respiration devient de plus en plus importante. Il est à noter que pour une cyanobactérie, la vitesse maximale de croissance ($\langle r_{x_{max}} \rangle$) est obtenue dès qu'une zone sombre apparaît dans le réacteur et que tous les photons sont donc absorbés par la culture, et cette vitesse reste ensuite constante tant qu'aucune limitation minérale n'apparaît (Figure 44).

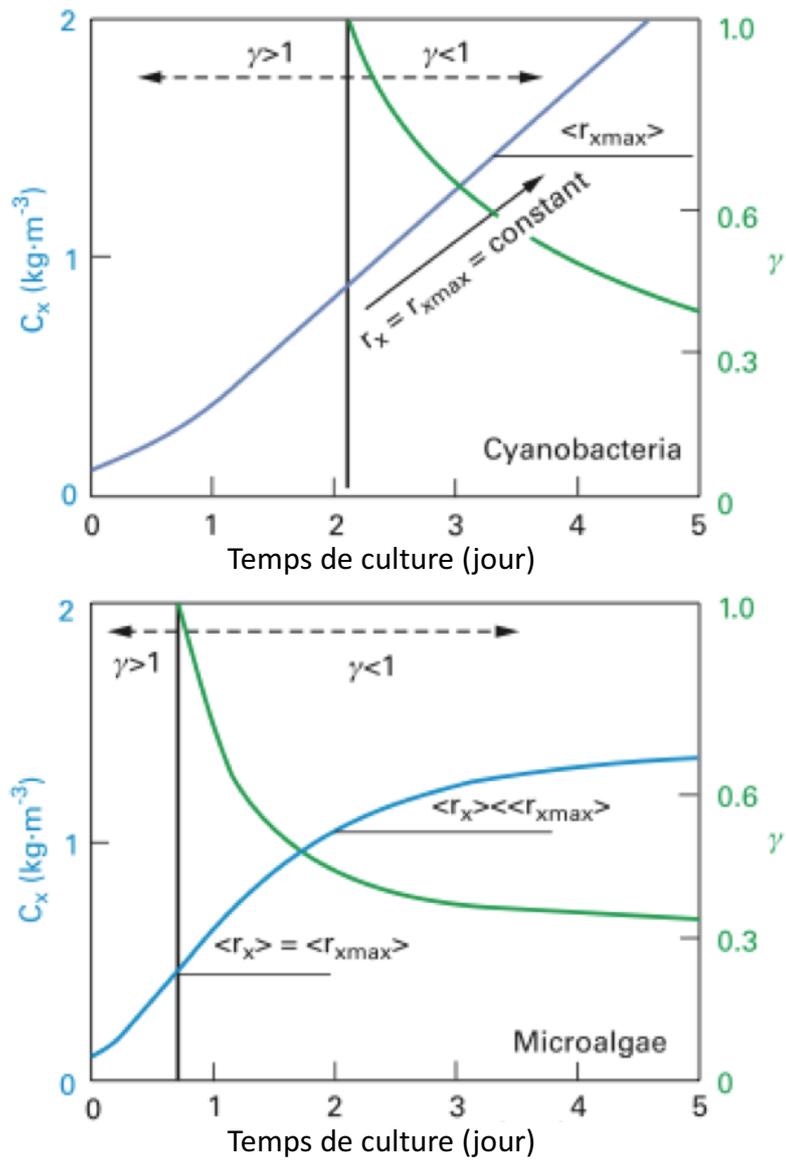


Figure 44 : évolution de la vitesse de croissance en fonction du temps dans une culture en mode discontinu (« batch ») pour une cyanobactérie (en haut) et une microalgue (en bas) (Pruvost and Cornet, 2012)

Il est à noter qu'il est possible de faire varier l'intensité du flux incident au cours de la culture de telle sorte que le profil d'irradiance soit constant (Cornet and Dussap, 2009).

Le mode continu consiste à alimenter en milieu frais une culture tout en gardant le volume réactionnel constant par un soutirage. Ce débit de soutirage (Q) permet de définir le taux de dilution (D) et le temps de séjour (τ) de la biomasse dans le réacteur selon l'équation (III-4). Ce mode présente l'avantage de pouvoir maintenir une concentration en biomasse donnée, donc des conditions d'atténuation de la lumière constantes (γ constant). Le taux de croissance est donc également constant ce qui permet de stabiliser les performances du système (éventuellement à $\langle r_{x_{max}} \rangle$) et de stabiliser les cellules dans un état métaboliquement stationnaire (Figure 45) (Pruvost and Cornet, 2012).

$$\tau = \frac{1}{D} = \frac{V_r}{Q} \quad (\text{III-4})$$

τ : temps de séjour (j)

D : taux de dilution (j^{-1})

V : volume réactionnel (L)

Q : débit de soutirage ($L.j^{-1}$)

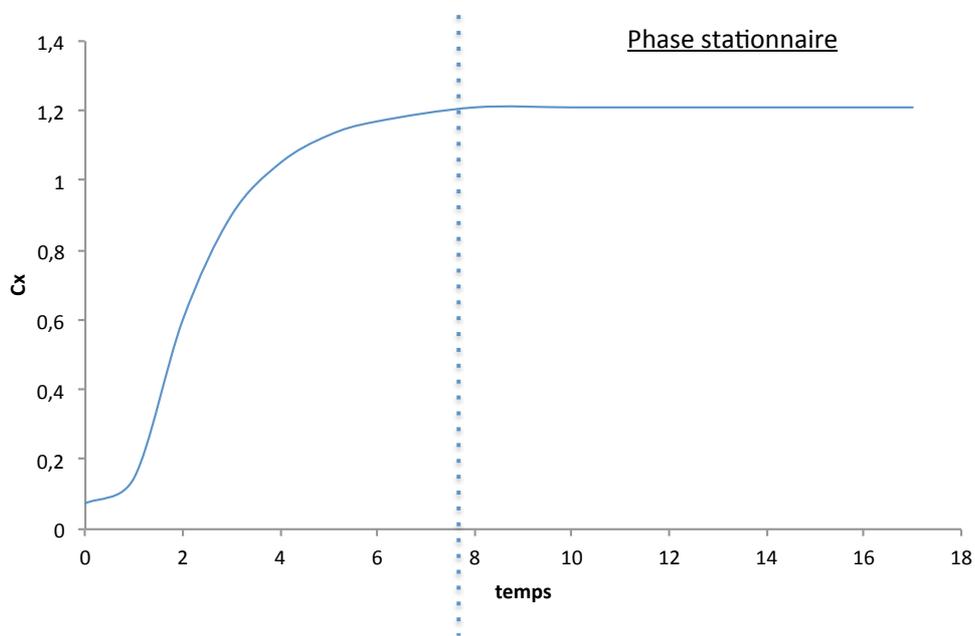


Figure 45 : évolution typique de la concentration en biomasse C_x d'une culture continue (chemostat), jusqu'à un équilibre correspondant à la phase stationnaire (avec application d'un taux de dilution faible évitant le lessivage de la culture).

Il existe deux modes de mise en œuvre d'une culture continue : le chemostat et le turbidostat. Lors d'un chemostat, la culture est continuellement alimentée en milieu frais et récoltée suivant un débit fixé et constant. Le mode turbidostat implique une boucle de rétrocontrôle entre la turbidité (imposée constante) du bioréacteur et le taux de dilution.

c Mode semi-continu

Il existe un mode de culture intermédiaire entre culture continue et discontinue, il s'agit du mode semi-continu ou « fed-batch » qui consiste à alimenter le réacteur en milieu neuf en continu ou par intermittence et de soutirer périodiquement la récolte de la biomasse produite (Lidén, 2002). Ce mode de production est souvent appliqué à échelle industrielle. C'est un bon compromis entre batch et continu.

d Productivité volumique et productivité surfacique

La productivité d'un système de culture est une grandeur largement utilisée pour caractériser une culture et/ou un système de culture. Dans le cadre d'une culture de microorganismes photosynthétiques, deux types de productivités peuvent être définis :

- la productivité volumique (P_x) qui est la quantité de biomasse (ou d'un métabolite cible) produite par volume de culture et par unité de temps. En photolimitation, elle est fonction de l'algue (rendement thermodynamique de la photosynthèse), du flux de photons incident reçu par l'algue et de la surface spécifique éclairée du PBR (a_s) (Cornet and Dussap, 2009).
- la productivité surfacique (S_x) qui est la quantité de biomasse produite par unité de surface de captation de lumière et par unité de temps. Elle est fonction de l'algue cultivée et du flux incident (intensité, angle d'incidence). En photolimitation, elle est indépendante de la géométrie du système de culture (Pruvost and Cornet, 2012).

Les deux valeurs sont directement proportionnelles, par l'intermédiaire de la surface spécifique du PBR (III-5), elle-même liée à la profondeur du PBR (III-6). Dans la mesure où la productivité surfacique est indépendante de la géométrie de culture, ces notions permettent de prévoir les différences de productivité volumique obtenues sous un même flux incident dans deux réacteurs plans où seules les profondeurs de culture (L) diffèrent (Figure 46).

La productivité d'un système de culture peut être mesurée ou déterminée théoriquement. Un effort important a été mené sur ce point par le laboratoire GEPEA, en relation avec l'Institut Pascal de Clermont-Ferrand. Une synthèse de ces travaux est disponible dans Pruvost et Cornet (2012). Aujourd'hui, cela permet de disposer d'un ensemble d'outils et modèles prédictifs validés. Cela a permis par exemple de calculer les limites de productivité en conditions d'exploitation solaires discutées dans le paragraphe III.1.3. Dans (Pruvost *et al.*, 2011), il a également été montré la robustesse des modèles pour extrapoler les productivités entre systèmes de culture différents. A partir de données obtenues en PBR contrôlé de laboratoire, il est ainsi possible de déterminer les productivités en conditions d'exploitation à grande échelle, faisant de ces expérimentations à petite échelle des étapes clés du développement des procédés industriels.

$$Px = \frac{Sx \cdot S}{V} = Sx \cdot a_s \quad (\text{III-5})$$

Px : productivité volumique (kg.m⁻³.j⁻¹)

Sx : productivité surfacique (kg.m⁻².j⁻¹)

S : surface éclairée du système (m²)

V : volume du système (m³)

a_s : surface spécifique (m⁻¹)

$$a_s = \frac{1}{L} \quad (\text{III-6})$$

L : profondeur du PBR (pour un PBR plan)

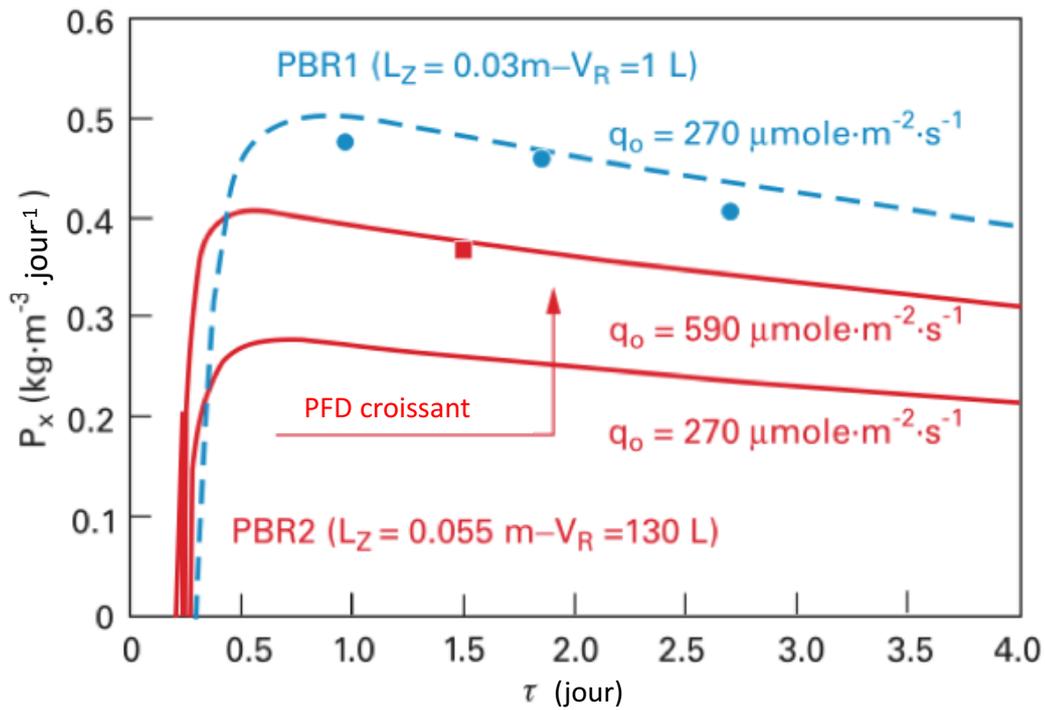


Figure 46 : comparaison des productivités volumique en biomasse pour deux flux incidents différents dans le même réacteur (PBR2) et dans deux réacteurs plans différant par leur profondeur (notée ici L_z) sous le même flux incident (ici pour $q_0 = 270 \mu\text{mole}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) (Pruvost and Cornet, 2012).

Une productivité peut être mesurée à partir d'une culture batch (III-7) ou d'une culture continue. Dans le premier cas, le calcul est basé sur l'augmentation de la concentration en biomasse C_x pendant la durée de la culture. Dans le second cas, la productivité est donnée par la quantité de biomasse récoltée au cours du temps. A l'état stationnaire, elle est donnée par l'équation (III-8).

En mode batch :

$$Px = \frac{Cx_t - Cx_0}{t} \quad (\text{III-7})$$

Px : productivité volumique (kg.m⁻³.j⁻¹)

Cx_t : concentrations en biomasse en fin de culture (kg.m⁻³)

Cx₀ : concentrations en biomasse en début de culture (kg.m⁻³)

t : durée de la culture (j)

En mode continu, à l'état stationnaire :

$$Px = \frac{Cx}{\tau} = Cx \cdot D = r_x \quad (\text{III-8})$$

Px : productivité volumique (kg.m⁻³.j⁻¹)

Cx : concentration en biomasse à l'état stationnaire (kg.m⁻³)

τ : temps de séjour (j)

D : taux de dilution (j⁻¹)

r_x : vitesse de croissance (kg.m⁻³.j⁻¹)

III.2 Culture de *B. braunii* en photobioréacteur

B. braunii est en général étudiée en laboratoire dans des conditions classiques. En effet, le milieu de culture, la salinité, la température et l'intensité lumineuse utilisés ont des valeurs typiques pour une microalgue d'eau douce. De manière générale, une concentration plus élevée en nitrates allonge la croissance de l'espèce et un air enrichi en CO₂ l'accélère. La croissance très lente de *B. braunii* la rend très sensible à une erreur de manipulation, de paramétrage, à une contamination, qui peuvent devenir très rapidement fatales. Pour cette raison, la culture de *B. braunii* est réputée être difficile à maîtriser. La bibliographie permet d'identifier les principaux paramètres de culture.

III.2.1 Paramètres de culture de *B. braunii*

a Paramètres chimiques

i. Milieux de culture utilisés

Le milieu le plus utilisé est le milieu Chu13 car c'est celui qui a montré les meilleurs résultats de croissance en laboratoire (Largeau *et al.*, 1980a). Le milieu AF-6, contenant des vitamines (biotine, thiamine, B6, B12), est utilisé pour conserver les souches en laboratoire (en collections) car l'effet du manque de vitamines à long terme est mal connu (Watanabe and Tanabe, 2013). Le milieu BG11 (Dayananda *et al.*, 2007) et le milieu BBM-3N (CCAP) sont aussi utilisés.

ii. Phosphates

Dans un milieu de culture classique, comme le milieu Chu13, le phosphate n'est pas limitant pour la croissance de *B. braunii* (Casadevall *et al.*, 1985a). Néanmoins, il paraît jouer un rôle dans la production d'hydrocarbures car leur productivité est augmentée, de l'ordre de 25 %, dans un milieu riche en phosphate.

La concentration en phosphate diminue rapidement dès le début de la culture jusqu'à atteindre la limite de détection (Casadevall *et al.*, 1985b). La concentration reste ainsi jusqu'au milieu de la phase linéaire, où elle remonte et atteint un palier dès la décélération de la croissance. De nombreuses algues peuvent absorber rapidement de grandes quantités de phosphate, en quantité largement supérieure à leur besoin. Le surplus non utilisé par la cellule est souvent stocké sous forme de granules de polyphosphates. L'absence de phosphate mesuré dans le milieu ne signifie donc pas nécessairement qu'il y a limitation. Chez *B. braunii*, cette augmentation en fin de culture batch est forte. Elle suit probablement le phénomène habituel d'une algue et est peut-être amplifiée par un phénomène de désorganisation cellulaire concomitant (Casadevall *et al.*, 1985b).

iii. Sources d'azote

La source d'azote classiquement utilisée sont les nitrates. Dans un milieu de culture classique, l'azote est souvent le composé limitant principal. Une augmentation des nitrates dans le milieu de culture permet d'allonger la phase exponentielle (Brenckmann, 1984) et d'augmenter la quantité de biomasse finale. La quantité d'hydrocarbures est plus faible dans cette biomasse (Shimamura *et al.*, 2012). En carence azotée, *B. braunii* accumule des lipides sous forme de TAG (Zhila *et al.*, 2005), comme la plupart des algues.

B. braunii aurait une meilleure croissance sous KNO_3 que sous NaNO_3 (Dayananda *et al.*, 2007). La croissance sous nitrite (NO_2^-) est possible jusqu'à des concentrations supérieures à 8 mM, qui inhibent la croissance (Yang *et al.*, 2004). L'utilisation d'ammonium comme source d'azote provoque une baisse de l'activité photosynthétique et de la respiration, et une inhibition presque complète de la production d'hydrocarbures (Ohmori *et al.*, 1984).

iv. Carbone inorganique et pH

Le bullage par un air enrichi en CO_2 permet de stabiliser le pH et d'apporter du carbone aux cellules. Le bullage par un mélange air/ CO_2 1%, par rapport à un air non enrichi, permet de multiplier par quatre la production de biomasse et par cinq la production d'hydrocarbures (Chirac *et al.*, 1985). Shimamura *et al.* (2012) montrent que le CO_2 est un facteur limitant la croissance en culture extérieure (PBR dome de 300L sous serre), la croissance est fortement améliorée avec 1% CO_2 . Des aérations allant jusqu'à 20% CO_2 et améliorant la croissance ont été utilisées (Rao *et al.*, 2007).

D'après Watanabe et Tanabe (2013) *B. braunii* est peu sensible au pH. Elle peut indifféremment être cultivée à des pH allant de 6 à 8,5 (Dayananda *et al.*, 2007). Un bloom de *B. braunii* peut avoir lieu dans une eau à pH supérieur à 8 (Wake and Hillen, 1980). En culture, sous bullage CO_2 , le pH évolue dans cet intervalle (Casadevall *et al.*, 1985b). Le pH du milieu de culture est ajusté autour de 7 avant autoclavage (Casadevall *et al.*, 1985a; Tanoi *et al.*, 2011). Le pH est minimal au début de la culture, environ 7, avant d'exposer l'algue à la lumière. Au cours d'une culture airlift à 1% CO_2 , le pH monte avec la concentration en biomasse jusqu'à atteindre un maximum dès le début de la phase de décélération avec un pH

proche de 8. L'augmentation est principalement due à la consommation du CO₂ dissous. Ce phénomène est souvent observé chez les algues en phase exponentielle (Casadevall *et al.*, 1985b).

v. NaCl

Il a été montré que *B. braunii* peut croître dans un milieu salé (Aaronson *et al.*, 1983). Certaines souches ont la même croissance, parfois meilleure, en eaux légèrement salées (0,15M) qu'en eau douce (Li and Qin, 2005). Certaines souches survivent à une salinité de 3M NaCl (Vazquez-Duhalt and Arredondo-Vega, 1991).

vi. Métaux

Certaines souches de *B. braunii* se sont révélées sensibles aux concentrations en micronutriments du milieu Chu13 classique. Tanoi *et al.* (2011) divisent leurs concentrations par 100 pour l'étude de certaines souches.

vii. Vitamines

Les besoins en vitamines ont été peu étudiés. Le milieu utilisé par Watanabe and Tanabe (2013) pour la préparation des inoculum est supplémenté en vitamines (milieu AF6). La plupart des milieux utilisés dans la littérature n'ont pas de vitamines ajoutées. Une étude a montré que certaines souches de *B. braunii* sont autotrophes vis à vis de la vitamine B12 (Tanabe *et al.*, 2012).

b Paramètres physiques

i. Température

La plupart des souches croît librement sur un large spectre de température (20-30°). Cela fait de *B. braunii* un bon candidat pour la culture extérieure (Watanabe and Tanabe, 2013). La température optimale d'une souche à une autre est très variable (Li and Qin, 2005). La plupart des souches atteint sa croissance maximale entre 25 et 28°C (Li and Qin, 2005; Lupi *et al.*, 1994). A noter cependant que la température optimale pour la croissance ne correspond pas toujours à la température optimale pour la production d'huile (Watanabe and Tanabe, 2013).

Les températures inférieures à 20° ont été très peu étudiées. La croissance serait ralentie pour plusieurs souches (Murakami and Ikenouchi, 1997). Au delà de 30°C, certaines souches ont une croissance inhibée, d'autres ont une croissance ralentie (Murakami and Ikenouchi, 1997). Les souches de race B sont prélevées dans des environnements chauds en général. La souche de race B isolée par Watanabe *et al.* (2011) a ainsi une température optimale de croissance supérieure ou égale à 30°C.

ii. Intensité lumineuse

B braunii accepte une large gamme d'intensité lumineuse. L'intensité lumineuse reçue jouerait un rôle sur la croissance de la culture et sur la production d'hydrocarbures. La valeur optimale pour la croissance de l'algue serait la même que pour la production d'hydrocarbures. Elle a été déterminée à 235 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ par Brenckmann (1984).

Plusieurs cultures réalisées avec une même souche à différentes irradiances ont montré qu'à faible irradiance (40 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) la concentration en biomasse maximale atteinte est plus faible mais atteinte plus vite. En fin de culture batch, la concentration en lipides totaux augmente alors que la biomasse totale décline progressivement (Kojima and Zhang, 1999).

Une irradiance moyenne (150-200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) semble favorable à la croissance et à la formation d'hydrocarbures. Les globules intracellulaires de lipides neutres sont plus abondants (Brenckmann, 1984; Sakamoto *et al.*, 2012).

iii. Agitation

Le paramètre agitation n'a pas fait l'objet de publication. Les données relatives à ce paramètre sont issues d'observations sporadiques. De manière générale, l'agitation limite la taille des colonies lorsqu'elles atteignent une taille critique (Bailliez *et al.*, 1985). Une fragmentation plus fréquente est aussi observée lorsque la matrice est fragilisée, notamment en présence d'un bullage enrichi en CO₂.

i. Influence de la souche

L'expression des hydrocarbures est très dépendante de la souche mais également du clone cultivé. En effet, des différences importantes dans la composition en lipides sont observées parmi les souches d'une même race (Metzger and Largeau, 1999), particulièrement dans la race A. Au niveau clonal, un exemple est celui de la souche Showa, isolée par Nonomura (1988) pour sa forte teneur en HC, parmi 2000 clones de la souche Berkeley.

ii. Cultures associées

La présence de bactéries attachées à des cellules algales est connue, particulièrement chez les algues coloniales (Chirac *et al.*, 1985). Quelques cultures de *B. braunii* associées avec d'autres microorganismes couramment rencontrés dans les environnements aquatiques ont été testées. Elles ne sont pas nombreuses du fait de la difficulté d'obtenir des cultures axéniques de *B. braunii*. Une culture associée pourrait permettre une augmentation de la production en hydrocarbures et une réduction importante des risques de contamination (Chirac *et al.*, 1985). Le maintien de l'axénicité d'une culture est en effet extrêmement difficile à grande échelle.

L'algue, la bactérie ou la levure associée à une souche axénique peut provoquer des effets négatifs ou positifs sur la production de biomasse ou d'hydrocarbures. Toutefois, la présence d'un autre microorganisme dans une culture de *B. braunii* n'est pas essentielle pour la production de forts taux d'HC (Chirac *et al.*, 1985).

Tanabe *et al.* (2012) ont proposé que les bactéries en bâtonnets observées autour des colonies de certaines souches pourraient être à l'origine de la formation de grandes colonies et peut-être de productivités en HC plus importantes. Dans la souche étudiée, les bactéries forment comme un biofilm autour des colonies. Cette association, résistante à une tentative d'axénisation, semble volontiers être une relation mutualiste à long-terme plutôt qu'une contamination accidentelle.

III.2.2 Exemples de cultures de la microalgue *B. braunii* en photobioréacteur

a Culture batch typique

B. braunii a presque exclusivement été étudiée en culture batch. Ce paragraphe présente quelques résultats typiques de culture de cette microalgue.

i. Phase de latence

Les cultures menées en laboratoire sont en général obtenues avec un inoculum relativement important, de 0,3 à 0,5 g/L (Casadevall *et al.*, 1985a). Cela réduit considérablement le temps de latence qui se réduit alors à quelques jours (2 à 4 jours).

ii. Phase exponentielle

La croissance de *B. braunii* est lente. Belcher (1968) rapporte un temps de doublement d'une semaine, en conditions de culture standard. Le temps de doublement minimal mesuré est de 2,3 jours en conditions airlift, avec 1% CO₂ (Casadevall *et al.*, 1985b). Ces conditions, d'après les auteurs, ne sont pas encore optimales. Il reste en effet encore très élevé par rapport à d'autres microalgues qui peuvent doubler leur population en 6h à 8h (7x moins que *B. braunii*).

La proportion d'HC varie en fonction du stade de croissance, passant par exemple de 16 à 38 %MS en 3 jours, de la mise en culture au début de la phase exponentielle, puis jusqu'à 44 %MS en milieu de phase exponentielle. Une forte production en culture continue, où les cellules sont en division permanente, est observée, jusqu'à 26 %MS (Casadevall *et al.*, 1985b). A l'inverse, la masse moyenne par cellule diminue pendant les premiers jours de culture et atteint un minimum (0,35 ng/cellule) pendant la phase linéaire (Bailliez *et al.*, 1985).

iii. Phase stationnaire

B. braunii est souvent caractérisée par une dégénérescence qui intervient tôt dans la croissance de l'algue, dès la décélération de la croissance. Elle est caractérisée par une décoloration rapide de la biomasse et un arrêt de la synthèse des HC (Casadevall *et al.*, 1985b) (Figure 47). La même souche que précédemment, qui contient 44 %MS d'hydrocarbures en milieu de phase exponentielle n'en contient plus que 23 %MS en fin de batch (début de phase stationnaire). Les HC pourraient être dégradés par des bactéries capables de cataboliser les HC extracellulaires (Casadevall *et al.*, 1985a), ou par utilisation de ces HC pour la synthèse du polymère de matrice, *B. braunii* n'étant pas capable de dégrader ses propres HC (Largeau *et al.*, 1980b).

A ce même instant de la croissance, une augmentation de la viscosité de la culture est observée chez les souches de race A et B. Cette augmentation est due à la dissolution dans le milieu des exopolysaccharides (EPS) fibreux de l'algue (Metzger *et al.*, 1985a) : 3,9 %MS d'EPS sont isolés de la biomasse en phase exponentielle (2 semaines de croissance) puis 5,1 %MS en début de phase stationnaire (3 semaines) (Metzger *et al.*, 1993). Cette production apparaît quand le taux de croissance de l'algue diminue (Casadevall *et al.*, 1985b). Ce comportement est commun chez de nombreuses microalgues lorsque l'azote devient limitant notamment.

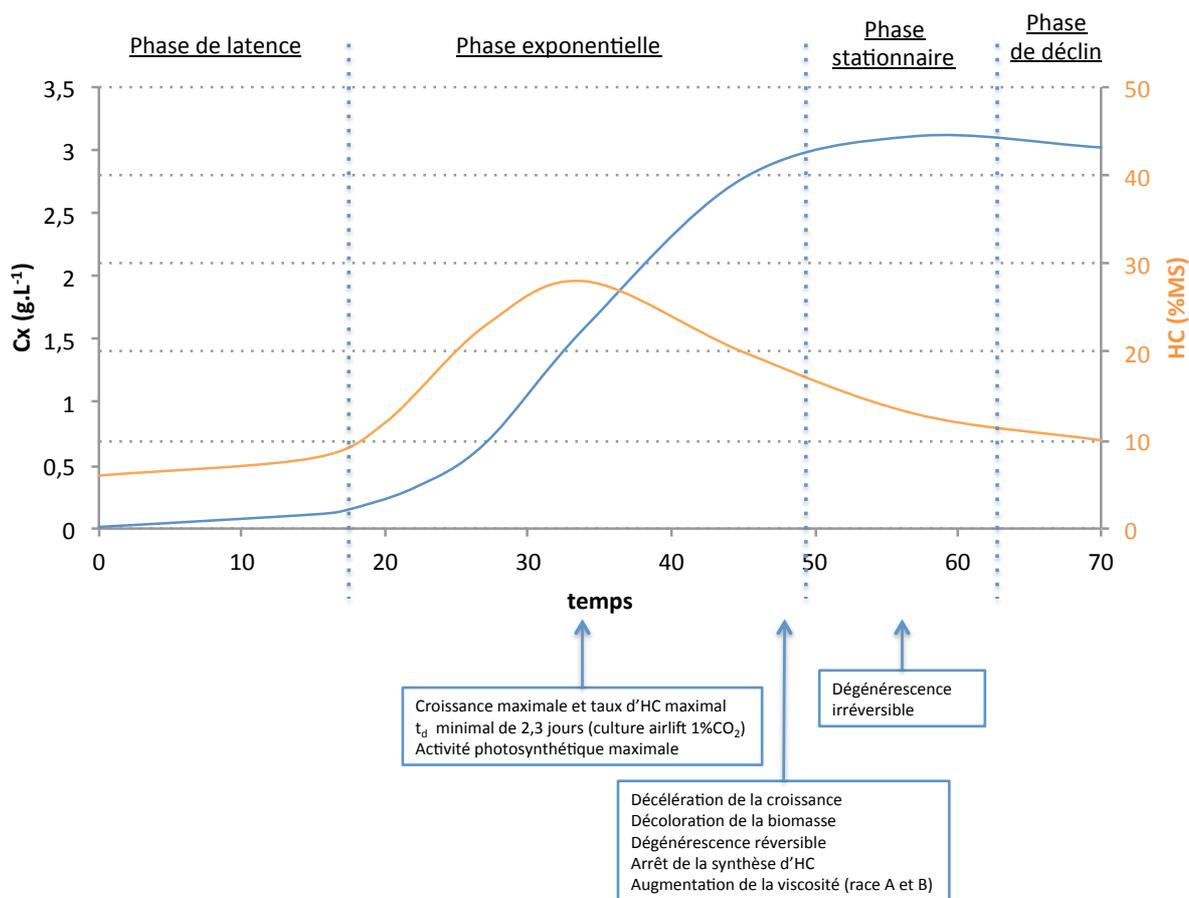


Figure 47 : évolution typique de la biomasse et des HC dans une culture batch de *B. braunii* (d'après Casadevall *et al.*, 1985b). L'échelle de temps, en abscisse est donnée à titre indicatif.

b Cultures standard en fiole Erlenmeyer

Les cultures en conditions standard permettent de conserver des souches en milieu liquide et/ou de préparer de la biomasse à la mise en culture en réacteur. Les conditions adoptées sont « douces ». Quel que soit le volume (50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, micropuits), l'intensité lumineuse utilisée dépasse rarement les $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, avec ou sans cycle jour/nuit (Chirac *et al.*, 1985; Sakamoto *et al.*, 2012; Tanoi *et al.*, 2011). L'agitation est souvent manuelle ou de maximum 100 rotations par minute (RPM). Les températures oscillent entre 22 et 25°C.

Ces cultures durent souvent 2 mois avec un milieu Chu13 modifié (Casadevall *et al.*, 1985a; Metzger *et al.*, 1985a) sans supplémentation en carbone (NaHCO₃ ou CO₂). Le temps de génération est en général d'au moins une semaine (Belcher, 1968; Chirac *et al.*, 1985; Chu, 1942). Les cultures sont caractérisées par une augmentation du contenu en chlorophylle et une

augmentation de l'activité photosynthétique (Brenckmann, 1984). Le Tableau 9 présente quelques cultures avec leurs paramètres opératoires principaux et quelques résultats de croissance ($C_{x_{max}}$) et de production d'HC.

Tableau 9 : paramètres de quelques cultures standard, concentration maximale ($C_{x_{max}}$) en biomasse atteinte et pourcentages d'hydrocarbures mesurés.

Souche (race)	Agitation	Eclairement en $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (périodicité jour/nuit en heures)	$C_{x_{max}}$ (g/L)	HC mesurés (%MS)	Réf.
807/1 (A)	Non	40 (12/12)	5,45	NP	Templier <i>et al.</i> , 1984
807/1 (A)	Non	40 (12/12)	NP	15	Largeau <i>et al.</i> , 1980b
Paquemar (B)	Oui	100 (14/10)	NP	38,1	(Metzger <i>et al.</i> , 1985a)
Chateaubrun (B)	Oui	100 (14/10)	NP	37,2	(Metzger <i>et al.</i> , 1985a)
La Manzo (B)	Oui	100 (14/10)	NP	32-37,6	(Metzger <i>et al.</i> , 1985a)
BOT-22 (B)	Oui (par bullage)	100 (24/0)	2	27	Sakamoto <i>et al.</i> , 2012
Gottingen (A)	Oui (par bullage)	400 (24/0)	2,1	8	Chirac <i>et al.</i> , 1985

NP : Non Précisé

c Cultures en photobioréacteur airlift

Un meilleur temps de génération a été obtenu au début des années 1980, sous éclairage continu et agitation par un air enrichi par 1% en CO_2 , avec 2,3 jours (Casadevall *et al.*, 1985b; Largeau *et al.*, 1980a). Une culture batch peut atteindre 6g/L de concentration maximale en biomasse ($C_{x_{max}}$) en environ 4 semaines de culture et contenir 30% d'hydrocarbures avec un milieu Chu concentré 4 fois (x4). Les résultats dépendent étroitement de la souche cultivée et des conditions de culture (Tableau 10 et Tableau 11). Les pourcentages d'HC mesurés vont de 3 à 61 %MS pour les souches de race A, de 18 à 40 %MS pour les souches de race B. Quelques cultures continues ont été réalisées en PBR airlift (Tableau 11), permettant d'obtenir des productivités en HC de l'ordre de $0,1 \text{ g.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ (Casadevall *et al.*, 1985b).

Tableau 10 : résultats de croissance et production de lipides obtenus dans différentes conditions de culture airlift en mode batch.

Souche (race)	%CO ₂	Eclairement continu (μmol.m ⁻² .s ⁻¹)	t _d (jour)	C _{xmax} (g/L)	Lipides mesurés (%MS)	Réf.
Race A						
UTEX 572 (A)	1%	250	2	3,8	HC 3 AGT 6 SL 0,1	Metzger <i>et al.</i> , 1990
Coat-ar-herno (A)	1%	250	NP	4	HC 2,6 ETH 28	Metzger and Casadevall, 1991
Austin (A)	1%	470	NP	3,7	PS 5,1	(Metzger <i>et al.</i> , 1993)
Chaumeçon (A)	1%	470	NP	NP	HC 61	Metzger <i>et al.</i> , 1985a
Crescent (A)	1%	470	NP	NP	HC 40,1	Metzger <i>et al.</i> , 1985a
Lingoult (A)	1%	470	NP	NP	HC 32,4	Metzger <i>et al.</i> , 1985a
Oukaimden (A)	1%	470	NP	NP	HC 19,2	Metzger <i>et al.</i> , 1985a
Oukaimden (A)	1%	470	NP	NP	HC 42,3	Metzger <i>et al.</i> , 1985a
Austin (A)	1%	470	NP	NP	HC 20	Metzger <i>et al.</i> , 1985a
807/1 (A)	1%	120	NP	5,45	HC 23,3	Casadevall <i>et al.</i> , 1985b
Austin (A)	1%	460	4,7	4,2	HC 4,8	Bailliez <i>et al.</i> , 1985
807/1 (A)	1%	120	NP	3,4	HC 21,5	Casadevall <i>et al.</i> , 1985b
Austin (A)	1%	460	4,7	4,2	HC 4,8	Bailliez <i>et al.</i> , 1985
807/1 (A)	1%	120	NP	3,4	HC 21,5	Casadevall <i>et al.</i> , 1985b
Austin (A)	1%	400	2,7	2,17	HC 26	Chirac <i>et al.</i> , 1985
Thonon (A)	1%	400	NP	1,3	HC 5	Chirac <i>et al.</i> , 1985
Gottingen (A)	1%	400	NP	3,73	HC 19	Chirac <i>et al.</i> , 1985
Thonon non axénique (A)	1%	400	NP	1,72	HC 7	Chirac <i>et al.</i> , 1985
Race B						
La Manzo (B)	1%	470	2	NP	AGT 14	Metzger <i>et al.</i> , 1990
Overjuyo (B)	1%	170	NP	NP	HC 58	Metzger <i>et al.</i> , 2008
La Manzo (B)	1%	470	NP	NP	PS 3,2	Metzger <i>et al.</i> , 2007
Kossou (B)	1%	470	NP	NP	PS 6,9	Metzger <i>et al.</i> , 2007
La Manzo (B)	1%	250	2	NP	LT 55,8 HC 28,4	Plain <i>et al.</i> , 1993
La Manzo 1 (B)	2%	120	NP	3,46	HC 18	Frenz <i>et al.</i> , 1989
BOT-22 (B)	1%	70	5,8	1,5	LT 42	Tanabe <i>et al.</i> , 2012
NIES souche non précisée (B)	1%	188	4,1	2,5	LT 80	Kojima and Zhang, 1999
NIES souche non précisée (B)	1%	188	1,5	7	LT 55	Kojima and Zhang, 1999
Ba10 (B)	1%	70	6,9	2,6	LT 44	Tanabe <i>et al.</i> , 2012
BOT-22 (B)	1%	100	12,4	1,3	HC 40	Shimamura <i>et al.</i> , 2012
BOT-22 (B)	1%	100	10,8	1,4	HC 40	Shimamura <i>et al.</i> , 2012
Race L						
Yamoussoukro (L)	1%	470	2	NP	AGT 5	Metzger <i>et al.</i> , 1990
Lacs Kossou (L)	1%	470	2	NP	NP	Metzger <i>et al.</i> , 1990
Songkla Nakarin reservoir (L)	1%	470	2	NP	NP	Metzger <i>et al.</i> , 1990

NP : Non Précisé ; PS : polymère soluble ; HC : hydrocarbures ; SL : stérols libres ; AGT : acides gras totaux ; ETH : lipides éthers

Tableau 11 : résultats de croissance et de production des lipides obtenus en culture en PBR airlift en mode continu (Casadevall *et al.*, 1985a, 1985b).

Souche (race)	%CO ₂	Eclairement ($\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$), période jour/nuit	t _d (jour)	Cx à l'état stationn aire (g/L)	rx (mg/L/j)	HC mesurés (%MS)
807/1 (A)	1%	120	2,3	1,35	324	27
807/1 (A)	1%	120	2,8	1,49	373	26,1
807/1 (A)	1%	240	3,4	0,90	182	11,2
807/1 (A)	1%	240	3,4	0,72	145	7,4
807/1 (A)	1%	240	3,4	0,55	111	13,7
807/1 (A)	1%	240	3,4	0,70	141	11

Dans l'ensemble de ces cultures, la température est toujours comprise entre 22 et 25°C. Le pH est en général ajusté à une valeur de 7,5 et un bullage constant de CO₂ à 1% dans l'air permet en général de maintenir cette valeur (Largeau *et al.*, 1980b; Templier *et al.*, 1984).

d Photobioréacteurs utilisés pour les cultures de *B. braunii*

Dans le cas des cultures airlifts, différentes géométries de photobioréacteurs (PBR) ont été utilisées (Tableau 12), allant d'un volume faible (plusieurs dizaines de millilitres) à des grands volumes préindustriels (480 L). Certaines cultures ont été menées en lumière naturelle (Shimamura *et al.*, 2012) mais la plupart des cultures en laboratoire sont éclairées à l'aide de tubes fluorescents. Les PBR ont presque toujours une forme cylindrique, rarement plane.

Tableau 12 : Différents types de PBR utilisés pour la culture de *B. braunii*

Géométrie	Surface éclairée	Volume de culture	Agitation	Eclairage en $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (équipement)	Reference
Tubulaire	1 à 6 m ²	Jusqu'à 200 L	NP	Naturel	Gudin and Chaumont, 1981
Tubulaire	NP	700 mL	20 v/v/h	NP	Metzger <i>et al.</i> , 1985a, 1985b, 1990
Tubulaire	490 cm ²	800 mL	20 v/v/h	120 (tubes fluorescents)	
Tubulaire	850 cm ²	2 000 mL	15 v/v/h	120 (tubes fluorescents)	Casadevall <i>et al.</i> , 1985b
Tubulaire	230 cm ²	200 mL	NP	NP (tubes fluorescents)	Bailliez 1988
Tubulaire	NP	200 ml	100 v/v/h	NP	Frenz <i>et al.</i> , 1989
Tubulaire	NP	800 mL	14 v/v/h	NP (tubes fluorescents)	Chirac <i>et al.</i> , 1985
Tubulaire	NP	20 mL	45 v/v/h (7,5 v/v/h en fin de culture)	NP	Tanabe <i>et al.</i> , 2012
Tubulaire	460 cm ²	800 mL	30 v/v/h	NP (halogène)	Kojima and Zhang, 1999
Plan (flacon)	140 cm ² (3,5cm de profondeur)	500 mL	12 v/v/h	NP (DEL rouge monochromatique)	Sakamoto 2012
Tubulaire	1980 cm ²	10 L	NP	NP (tubes fluorescents)	Shimamura <i>et al.</i> , 2012
« Tubulaire » (sacs en polyéthylène)	1570 cm ²	10 L	NP	NP (tubes fluorescents)	Shimamura <i>et al.</i> , 2012
Tubulaire	5650 cm ²	30 L	NP	NP (tubes fluorescents)	Shimamura <i>et al.</i> , 2012
Tubulaire	5030 cm ² (chaque unité)	480 L (40 tubes indépendants)	NP	Naturel sous serre	Shimamura <i>et al.</i> , 2012
Dome	20 cm profondeur de culture	300 L	NP	Naturel sous serre	Shimamura <i>et al.</i> , 2012

NP : Non Précisé

Peu d'études sur la culture de *B. braunii* à l'échelle préindustrielle ou industrielle sont disponibles. Les premières ont été celles de Gudin et Chaumont (1981) dans un réacteur tubulaire de 200 L. Plus récemment, des cultures ont été menées en PBR en dome de 300L et dans une combinaison de 40 PBR tubulaires qui, additionnés, représentent un volume de 480 L (Shimamura *et al.*, 2012) (Figure 48). Ces dernières ont été conduites en mode semi-continu sous lumière naturelle (sous serre) en période automne-hiver dans le PBR « Dome » (températures de 14 à 22°) et printanière dans la combinaison de PBR tubulaires (température de 14 à 37°). La lumière, pendant la journée, fluctuait entre 30 et 3100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Les taux de croissance ont été plus élevés dans les réacteurs tubulaires avec un temps de doublement t_d de 8,1 jours. Ces grandes installations à Tsukuba (Japon) ont permis d'obtenir des productions à une échelle semi-industrielle, mais avec des taux de croissance très faibles ($t_d > 8$ jours) (Tableau 13).

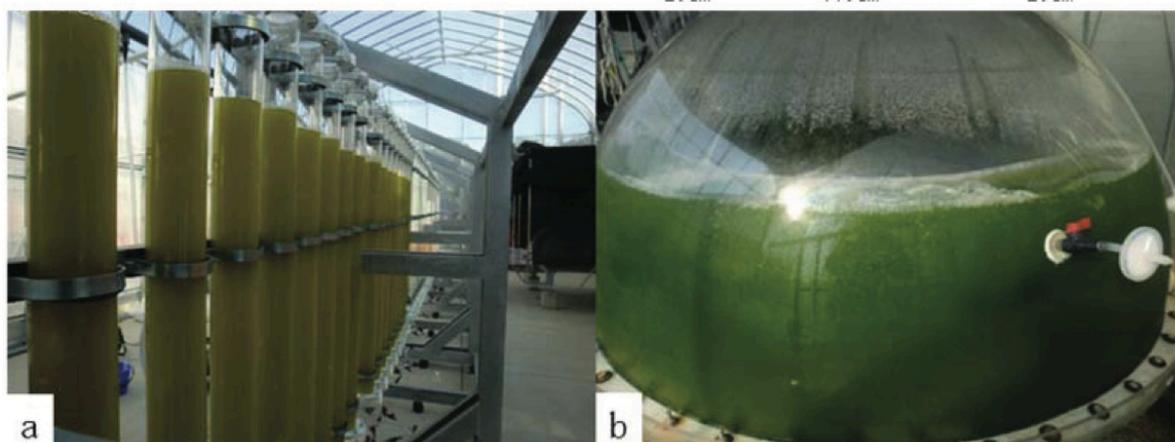


Figure 48 : PBR utilisés par Shimamura *et al.* (2012) pour une production à l'échelle pilote ; *a* correspond à la combinaison de PBR tubulaires représentant un volume total de 480 L, *b* correspond au PBR « Dome » de 300L.

Tableau 13 : résultats de croissance obtenus en PBR airlift en mode semi-continu, dans des conditions de production semi-industrielles (Shimamura *et al.*, 2012)

Souche (race)	Volume du PBR (L)	%CO ₂	Eclairage en $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	t _d (jour)	C _{x,max} (g/L)	HC mesurés (%MS)
BOT-22 (B)	10	1%	100	23,9 à 14,7	0,7 à 2,3	NP
BOT-22 (B)	300	1%	30-2000 lumière naturelle (automne)	21 à 16,9	0,25 à 0,6	NP
BOT-22 (B)	480	1%	30-2000 lumière naturelle (printemps)	8,1	1,2 à 3,7	NP

NP : Non Précisé

i. Contaminations

Toutes les cultures réalisées par Shimamura *et al.* (2012) ont été contaminées par d'autres microalgues et parfois par des protozoaires. *B. braunii* est toujours l'organisme majoritaire en début de culture mais est rapidement supplantée par une autre microalgue à croissance plus rapide. Les cultures à grande échelle à Tsukuba, en PBR « Dome » de 300 L, sont ainsi très contaminées par des protozoaires, d'autres algues et une quantité considérable de bactéries. Mais leur densité est faible et ces organismes n'affectent pas la croissance de *B. braunii* (Shimamura *et al.*, 2012). Le développement de souches résistantes à de fortes salinités (adaptation, manipulation génétique, mutant) pourrait être une solution pour limiter ces contaminations.

ii. Coûts

La maîtrise des coûts est cruciale pour des cultures à grande échelle. Des économies peuvent être réalisées par l'utilisation de solutions alternatives aux milieux de culture classiques. Shimamura *et al.* (2012) ont calculé que le milieu AF-6 qu'ils utilisent en laboratoire représente 20% du coût de production de l'huile finale. Le milieu K est estimé à 0,5 \$/tonne, 10,9 \$/tonne pour le milieu AF-6, soit vingt fois moins cher. Des cultures avec plusieurs types d'eaux usées ont également été testées. Leurs volumes disponibles sont très importants et leur utilisation pour la production de biomasse algale représenterait une valorisation économique et écologique (An *et al.*, 2003; Chinnasamy *et al.*, 2010; Sawayama *et al.*, 1994; Yonezawa *et al.*, 2012).

Des fortes économies peuvent aussi être réalisées par le choix des matériaux de construction des PBR. L'utilisation de sacs transparents en polyéthylène a été testée et proposée comme alternative pour la croissance de biomasse destinée à inoculer des réacteurs plus grands (mais pas pour la production proprement dite). Le prix des sacs est bon marché avec 30 \$ par sac (Shimamura *et al.*, 2012). A noter que Pruvost et Cornet (2012) préconisent, de leur côté, la mise en place de PBR optimisés pour améliorer les productivités, en particulier si l'objectif est d'aller vers une production à grande échelle et volume.

Conclusion

La microalgue *B. braunii* est connue pour produire et accumuler des lipides originaux. Depuis de nombreuses années cette microalgue est donc étudiée comme source potentielle de biocarburant, notamment de biokérosène. Ainsi, le potentiel des lipides de *B. braunii* n'a jamais fait l'objet d'études approfondies et nombreuses. Les rares études qui existent au sujet de l'activité biologique des lipides de *B. braunii* restent très classiques en exposant l'activité antioxydante des caroténoïdes et autre terpènes insaturés.

Les organismes vivants contiennent rarement des hydrocarbures en grande quantité. Les plus abondants dans le monde vivant sont des petites molécules (isoprène, éthylène), avec moins de 6 carbones, volatiles et non accumulées dans l'organisme. De même, les microalgues contiennent rarement des hydrocarbures en grande quantité. *Botryococcus braunii* est une des rares espèces à accumuler des hydrocarbures, à longue chaîne ($>C_{25}$) et parfois en très grande quantité. Les souches de *B. braunii* sont classées en trois classes en fonction de la structure des hydrocarbures majoritaires. La race A produit majoritairement des HC linéaires avec le plus souvent 2 à 3 insaturations. La race B produit des triterpènes de structure proche du squalène. La race L produit un seul hydrocarbure, plus long (C40), le lycopadiène. Les quantités d'HC accumulés sont très variables, allant de moins de 1 %MS à plus de 30 %MS. Ce taux dépend de la souche, des conditions de culture et de la race. La race L est ainsi peu accumulatrice. L'originalité de cette espèce ne s'arrête pas aux HC qu'elle produit. Elle peut produire d'autres lipides originaux en quantités non négligeables, eux aussi riches en motifs hydrocarbonés. En particulier, elle produit un polymère extracellulaire, très résistant, dans lequel s'accumule les HC. La croissance de l'algue se fait donc sous forme de colonies, du fait de la cohésion procurée par ce polymère. La croissance est par ailleurs très lente, améliorée dans la littérature par un air enrichi avec 1% de CO₂.

Il ressort du panorama des lipides et de leurs activités biologiques potentielles, exposé dans ce mémoire, qu'un potentiel existe pour l'industrie pharmaceutique avec les lipides de *B. braunii*. D'une part, les lipides classiques et les lipides les plus polaires ne sont jamais étudiés. D'autre part, les hydrocarbures de *B. braunii* sont originaux et spécifiques de cette espèce, et pourraient trouver des applications potentielles et nouvelles en nanomédecine. En effet dans

ce domaine, les laboratoires sont en recherche permanente de squelettes carbonés qui pourraient adopter des conformations originales. *B. braunii* produit aussi des polymères, à différents niveaux de réticulation. L'algue pourrait représenter une nouvelle source de biomatériaux biosourcés, avec des applications par exemple pour la fabrication de matériel médical.

Depuis 30 ans, *B. braunii* est étudiée pour son potentiel à produire des biocarburants. Le plus souvent, les cultures sont réalisées en fioles d'Erlenmeyer ou en tubes bullés. Elles ont permis de mettre en évidence que la production des HC est maximale lorsque l'algue est en croissance. Cette accumulation de lipides ne suit donc pas le schéma habituel de production de TAG qui est favorisée lorsque la division cellulaire est inhibée, en général obtenue en conditions de carence azotée. Pour aller plus loin dans l'étude de la microalgue *B. braunii*, il est nécessaire de réaliser des mesures dans des conditions contrôlées. La mise en culture en conditions contrôlées de lumière (lumière reçue et atténuation au sein du volume), comme cela est permis dans un réacteur plan, peut permettre d'extrapoler les résultats de productivités volumiques en productivités surfaciques (en terme de surface éclairée), et ainsi envisager le potentiel de *B. braunii* pour une production à grande échelle.

L'originalité de *B. braunii* la distingue des autres microalgues. Elle mériterait d'être étudiée pour son potentiel pharmaceutique au moins pour deux raisons :

- Son potentiel industriel est avéré et toutes les molécules d'intérêt industriel de *B. braunii*, y compris pharmaceutique, devront être valorisées ;
- Les microalgues sont parmi les organismes vivants les plus anciens, elles possèdent donc un fort potentiel pour découvrir de nouvelles molécules à activité biologique.

Bibliographie

- Aaronson, S., Berner, T., Gold, K., Kushner, L., Patni, N.J., Repak, A., and Rubin, D. (1983). Some observations on the green planktonic alga, *Botryococcus braunii* and its bloom form. *J. Plankton Res.* *5*, 693–700.
- Acquisti, C., Kleffe, J., and Collins, S. (2007). Oxygen content of transmembrane proteins over macroevolutionary time scales. *Nature* *445*, 47–52.
- An, J.-Y., Sim, S.-J., Lee, J.S., and Kim, B.W. (2003). Hydrocarbon production from secondarily treated piggery wastewater by the green alga *Botryococcus braunii*. *J. Appl. Phycol.* *15*, 185–191.
- Andersen, R.A. (2005). *Algal Culturing Techniques* (Academic Press).
- Andersen, R.A. (2013). The Microalgal Cell. In *Handbook of Microalgal Culture*, A.R.P.D. Emeritus, and Q.H. Ph.D, eds. (John Wiley & Sons, Ltd), pp. 1–20.
- Audino, M., Grice, K., Alexander, R., and Kagi, R.I. (2002). Macrocyclic alkanes in crude oils from the algaenan of *Botryococcus braunii*. *Org. Geochem.* *33*, 979–984.
- Baba, M., Ioki, M., Nakajima, N., Shiraiwa, Y., and Watanabe, M.M. (2012). Transcriptome analysis of an oil-rich race A strain of *Botryococcus braunii* (BOT-88-2) by *de novo* assembly of pyrosequencing cDNA reads. *Bioresour. Technol.* *109*, 282–286.
- Bailliez, C., Largeau, C., and Casadevall, E. (1985). Growth and hydrocarbon production of *Botryococcus braunii* immobilized in calcium alginate gel. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *23*, 99–105.
- Ball, S., Colleoni, C., Cenci, U., Raj, J.N., and Tirtiaux, C. (2011). The evolution of glycogen and starch metabolism in eukaryotes gives molecular clues to understand the establishment of plastid endosymbiosis. *J. Exp. Bot.* *62*, 1775–1801.
- Bauld, J. (1981). Occurrence of benthic microbial mats in saline lakes. In *Salt Lakes*, (Springer), pp. 87–111.
- Becker, E.W. (1994). *Microalgae: Biotechnology and Microbiology* (Cambridge University Press).
- Becker, E.W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnol. Adv.* *25*, 207–210.
- Becker, B., and Marin, B. (2009). Streptophyte algae and the origin of embryophytes. *Ann. Bot.* *103*, 999–1004.
- Beer, L.L., Boyd, E.S., Peters, J.W., and Posewitz, M.C. (2009). Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. *Curr. Opin. Biotechnol.* *20*, 264–271.

- Belcher, J.H. (1968). Notes on the physiology of *Botryococcus braunii* Kützing. *Arch. Microbiol.* *61*, 335–346.
- Berkaloff, C., Casadevall, E., Largeau, C., Peracca, M.S., and Virlet, J. (1983). The resistant polymer of the walls of the hydrocarbon-rich alga *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry* *22*, 389–397.
- Berkaloff, C., Rousseau, B., Couté, A., Casadevall, E., Metzger, P., and Chirac, C. (1984). VARIABILITY OF CELL WALL STRUCTURE AND HYDROCARBON TYPE IN DIFFERENT STRAINS OF *BOTRYOCOCCUS BRAUNII* 1. *J. Phycol.* *20*, 377–389.
- Berney, C., and Pawlowski, J. (2006). A molecular time-scale for eukaryote evolution recalibrated with the continuous microfossil record. *Proc. Biol. Sci.* *273*, 1867–1872.
- Bertheas, O., Metzger, P., and Largeau, C. (1999). A high molecular weight complex lipid, aliphatic polyaldehyde tetraterpenediol polyacetal from *Botryococcus braunii* (L race). *Phytochemistry* *50*, 85–96.
- Blackburn, K. (1936). A reinvestigation of the alga *Botryococcus braunii* Kützing. *Trans. R. Soc. Edinburgh* 841–854.
- Bodył, A., Stiller, J.W., and Mackiewicz, P. (2009). Chromalveolate plastids: direct descent or multiple endosymbioses? *Trends Ecol. Evol.* *24*, 119–121.
- Borowitzka, M.A. (1988). *Micro-algal Biotechnology* (Cambridge University Press).
- Brenckmann, F. (1984). Influence de la nutrition azotée et de l'intensité lumineuse sur la croissance et la production d'hydrocarbures de *Botryococcus Braunii* = Influence of nitrogenous nutrition and light intensity on growth and hydrocarbon production of *Botryococcus braunii*. Text. Paris XI Orsay.
- Brodie, J., and Lewis, J. (2007). Unravelling the algae: the past, present, and future of algal systematics. *Syst. Assoc. Spec. Vol. Ser.*
- Bruneton, J. (2009). *Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales* (Paris; Cachan: Tec & Doc Lavoisier).
- Buick, R. (2008). When did oxygenic photosynthesis evolve? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *363*, 2731–2743.
- Buono, S., Langellotti, A.L., Martello, A., Bimonte, M., Tito, A., Carola, A., Apone, F., Colucci, G., and Fogliano, V. (2012). Biological activities of dermatological interest by the water extract of the microalga *Botryococcus braunii*. *Arch. Dermatol. Res.* *304*, 755–764.
- Cane, R.F. (1969). Coorongite and the genesis of oil shale. *Geochim. Cosmochim. Acta* *33*, 257–265.
- Cane, R.F., and Albion, P.R. (1973). The organic geochemistry of torbanite precursors. *Geochim. Cosmochim. Acta* *37*, 1543–1549.
- Carletti, I., Massiot, G., and Debitus, C. (2012). Polyketide molecules as anticancer agents.

- Caron, J. (2011). Conception de nouveaux bioconjugués “squalénisés” anticancéreux dotés de propriétés d’auto-assemblage : synthèse, caractérisation des nanoparticules et évaluation biologique. phdthesis. Université Paris Sud - Paris XI.
- Casadevall, E., Bailliez, C., Berkaloff, C., Brenckmann, F., Chirac, C., Corre, B., Couté, A., Dif, D., Largeau, C., Metzger, P., *et al.* (1985a). Production d’hydrocarbures renouvelables par la culture de l’algue verte *Botryococcus braunii*. Etude des facteurs affectant la production des hydrocarbures. (Commission des Communautés européennes).
- Casadevall, E., Dif, D., Largeau, C., Gudin, C., Chaumont, D., and Desanti, O. (1985b). Studies on batch and continuous cultures of *Botryococcus braunii*: Hydrocarbon production in relation to physiological state, cell ultrastructure, and phosphate nutrition. *Biotechnol. Bioeng.* 27, 286–295.
- Catling, D.C., Glein, C.R., Zahnle, K.J., and McKay, C.P. (2005). Why O₂ is required by complex life on habitable planets and the concept of planetary “oxygenation time.” *Astrobiology* 5, 415–438.
- Cavalier-Smith, T. (1999). Principles of protein and lipid targeting in secondary symbiogenesis: euglenoid, dinoflagellate, and sporozoan plastid origins and the eukaryote family tree. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46, 347–366.
- Chinnasamy, S., Bhatnagar, A., Hunt, R.W., and Das, K.C. (2010). Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresour. Technol.* 101, 3097–3105.
- Chirac, C., Casadevall, E., Largeau, C., and Metzger, P. (1985). Bacterial Influence Upon Growth and Hydrocarbon Production of the Green Alga *Botryococcus Braunii* 1. *J. Phycol.* 21, 380–387.
- Chisholm, S.W., Frankel, S.L., Goericke, R., Olson, R.J., Palenik, B., Waterbury, J.B., West-Johnsrud, L., and Zettler, E.R. (1992). *Prochlorococcus marinus* nov. gen. nov. sp.: an oxyphototrophic marine prokaryote containing divinyl chlorophyll a and b. *Arch. Microbiol.* 157, 297–300.
- Christie, W.W. (2013). *The AOCS Lipid Library*.
- Chu, S.P. (1942). The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae: part I. Methods and culture media. *J. Ecol.* 284–325.
- Cornet, J.-F. (2010). Calculation of optimal design and ideal productivities of volumetrically lightened photobioreactors using the constructal approach. *Chem. Eng. Sci.* 65, 985–998.
- Cornet, J.-F., and Dussap, C.-G. (2009). A Simple and reliable formula for assessment of maximum volumetric productivities in photobioreactors. *Biotechnol. Prog.* 25, 424–435.

- Couté, A. (1987). Recherche, dans la nature, de souches de *Botryococcus braunii*, micro-algue élaborant des hydrocarbures. *Sci. Eau* 6, 3–9.
- Dayananda, C., Sarada, R., Usha Rani, M., Shamala, T.R., and Ravishankar, G.A. (2007). Autotrophic cultivation of *Botryococcus braunii* for the production of hydrocarbons and exopolysaccharides in various media. *Biomass Bioenergy* 31, 87–93.
- De Clerck, O., Bogaert, K.A., and Leliaert, F. (2012). Chapter Two - Diversity and Evolution of Algae: Primary Endosymbiosis. In *Advances in Botanical Research*, G. Piganeau, ed. (Academic Press), pp. 55–86.
- Delahais, V., and Metzger, P. (1997). Four polymethylsqualene epoxides and one acyclic tetraterpene epoxide from *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry* 44, 671–678.
- Delaux, P.-M., Nanda, A.K., Mathé, C., Sejalon-Delmas, N., and Dunand, C. (2012). Molecular and biochemical aspects of plant terrestrialization. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 14, 49–59.
- Delwiche, null (1999). Tracing the Thread of Plastid Diversity through the Tapestry of Life. *Am. Nat.* 154, S164–S177.
- Delwiche, C. (2007). CHAPTER 10 - The Origin and Evolution of Dinoflagellates A2 - Falkowski, Paul G. In *Evolution of Primary Producers in the Sea*, A.H. Knoll, ed. (Burlington: Academic Press), pp. 191–205.
- Dennis, E.A. (2010). Introduction to lipids.
- Derenne, S., and Largeau, C. (2001). A review of some important families of refractory macromolecules: composition, origin, and fate in soils and sediments. *Soil Sci.* 166, 833–847.
- Derenne, S., Largeau, C., Casadevall, E., and Berkaloff, C. (1989). Occurrence of a resistant biopolymer in the L race of *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry* 28, 1137–1142.
- Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H.A., Glass, C.K., Merrill, A.H., Murphy, R.C., Raetz, C.R.H., Russell, D.W., Seyama, Y., Shaw, W., *et al.* (2005). A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* 46, 839–862.
- Falkowski, P.G. (2006). Evolution. Tracing oxygen's imprint on earth's metabolic evolution. *Science* 311, 1724–1725.
- Falkowski, P.G., and Knoll, A.H. (2007). CHAPTER 1 - An Introduction to Primary Producers in the Sea: Who They Are, What They Do, and When They Evolved. In *Evolution of Primary Producers in the Sea*, (Burlington: Academic Press), pp. 1–6.
- Falkowski, P.G., and Raven, J.A. (2007). *Aquatic photosynthesis* (Princeton University Press).
- Falkowski, P.G., Katz, M.E., Knoll, A.H., Quigg, A., Raven, J.A., Schofield, O., and Taylor, F.J.R. (2004). The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science* 305, 354–360.

- Frenz, J., Largeau, C., Casadevall, E., Kollerup, F., and Daugulis, A.J. (1989). Hydrocarbon recovery and biocompatibility of solvents for extraction from cultures of *Botryococcus braunii*. *Biotechnol. Bioeng.* *34*, 755–762.
- Friedman, O., Dubinsky, Z., and Arad, S.M. (1991). Effect of light intensity on growth and polysaccharide production in red and blue-green rhodophyta unicells. *Bioresour. Technol.* *38*, 105–110.
- Gould, S.B. (2012). Evolutionary genomics: Algae's complex origins. *Nature* *492*, 46–48.
- Graham, L.E., Graham, J.M., and Wilcox, L.W. (2009). *Algae* (Benjamin Cummings, San Francisco, CA).
- Grobbelaar, J.U. (2013). Inorganic Algal Nutrition. In *Handbook of Microalgal Culture*, A.R.P.D. Emeritus, and Q.H. Ph.D, eds. (John Wiley & Sons, Ltd), pp. 123–133.
- Gross, J., and Bhattacharya, D. (2010). Uniting sex and eukaryote origins in an emerging oxygenic world. *Biol. Direct* *5*, 53.
- Grossman, A.R., Bhaya, D., Apt, K.E., and Kehoe, D.M. (1995). Light-harvesting complexes in oxygenic photosynthesis: diversity, control, and evolution. *Annu. Rev. Genet.* *29*, 231–288.
- Grung, M., Metzger, P., and Liaaen-jensen, S. (1989). Primary and secondary carotenoids in two races of the green alga *Botryococcus braunii*. *Biochem. Syst. Ecol.* *17*, 263–269.
- Grung, M., Metzger, P., Berkaloff, C., and Liaaen-Jensen, S. (1994). Studies on the formation and localization of primary and secondary carotenoids in the green alga *Botryococcus braunii*, including the regreening process. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* *107*, 265–272.
- Gudin, C., and Chaumont, D. (1981). For a solar biotechnology based on microalgae. In *Energy from Biomass*, (Springer), pp. 81–84.
- Guschina, I.A., and Harwood, J.L. (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog. Lipid Res.* *45*, 160–186.
- Hackett, J.D., Anderson, D.M., Erdner, D.L., and Bhattacharya, D. (2004). Dinoflagellates: a remarkable evolutionary experiment. *Am. J. Bot.* *91*, 1523–1534.
- Hahlbrock, K., and Scheel, D. (1989). Physiology and Molecular Biology of Phenylpropanoid Metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* *40*, 347–369.
- Herbland, A. (2007). La culture du phytoplancton dans les bassins aquacoles a fond de terre. *Asp. Théoriques Appl. Prat. IFREMERDAC Ed Nouv.-Caledonie*.
- Herron, M.D., Hackett, J.D., Aylward, F.O., and Michod, R.E. (2009). Triassic origin and early radiation of multicellular volvocine algae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 3254–3258.

- Hoek, C., Mann, D., and Jahns, H.M. (1995). *Algae: An Introduction to Phycology* (Cambridge University Press).
- Holland, H.D. (2006). The oxygenation of the atmosphere and oceans. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* *361*, 903–915.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., and Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* *54*, 621–639.
- Huang, Z., and Dale Poulter, C. (1989). Tetramethylsqualene, a triterpene from *Botryococcus braunii* var. *showa*. *Phytochemistry* *28*, 1467–1470.
- Ioki, M., Baba, M., Nakajima, N., Shiraiwa, Y., and Watanabe, M.M. (2012). Transcriptome analysis of an oil-rich race B strain of *Botryococcus braunii* (BOT-22) by *de novo* assembly of pyrosequencing cDNA reads. *Bioresour. Technol.* *109*, 292–296.
- Kadouri, A., Derenne, S., Largeau, C., Casadevall, E., and Berkaloff, C. (1988). Resistant biopolymer in the outer walls of *Botryococcus braunii*, B race. *Phytochemistry* *27*, 551–557.
- Kalacheva, G.S., Zhila, N.O., and Volova, T.G. (2002). Lipid and hydrocarbon compositions of a collection strain and a wild sample of the green microalga *Botryococcus*. *Aquat. Ecol.* *36*, 317–331.
- Kaplan, A., and Reinhold, L. (1999). CO₂ concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* *50*, 539–570.
- Kawachi, M., Tanoi, T., Demura, M., Kaya, K., and Watanabe, M.M. (2012). Relationship between hydrocarbons and molecular phylogeny of *Botryococcus braunii*. *Algal Res.* *1*, 114–119.
- Keeling, P.J. (2010). The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *365*, 729–748.
- Knoll, A.H., Javaux, E.J., Hewitt, D., and Cohen, P. (2006). Eukaryotic organisms in Proterozoic oceans. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *361*, 1023–1038.
- Kojima, E., and Zhang, K. (1999). Growth and hydrocarbon production of microalga *Botryococcus braunii* in bubble column photobioreactors. *J. Biosci. Bioeng.* *87*, 811–815.
- Kolattukudy, P.E. (1967). Biosynthesis of paraffins in *Brassica oleracea* : Fatty acid elongation-decarboxylation as a plausible pathway. *Phytochemistry* *6*, 963–975.
- Komárek, J., and Marvan, P. (1992). Morphological Differences in Natural Populations of the Genus *Botryococcus* (Chlorophyceae). *Arch. Für Protistenkd.* *141*, 65–100.
- Kuchitsu, K., Tsuzuki, M., and Miyachi, S. (1988). Characterization of the pyrenoid isolated from unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* : Particulate form of RuBisCO protein. *Protoplasma* *144*, 17–24.

- Ladygina, N., Dedyukhina, E.G., and Vainshtein, M.B. (2006). A review on microbial synthesis of hydrocarbons. *Process Biochem.* *41*, 1001–1014.
- Largeau, C., Casadevall, E., Berkaloff, C., and Dhamelinourt, P. (1980a). Sites of accumulation and composition of hydrocarbons in *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry* *19*, 1043–1051.
- Largeau, C., Casadevall, E., Berkaloff, C., and Dhamelinourt, P. (1980b). Sites of accumulation and composition of hydrocarbons in *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry* *19*, 1043–1051.
- Laureillard, J., Largeau, C., Waeghemaeker, F., and Casadevall, E. (1986). Biosynthesis of the resistant polymer in the alga *Botryococcus braunii*. Studies on the possible direct precursors. *J. Nat. Prod.* *49*, 794–799.
- Le Gouic, B. (2013). Analyse et optimisation de l'apport de carbone en photobioréacteur.
- Leliaert, F., Smith, D.R., Moreau, H., Herron, M.D., Verbruggen, H., Delwiche, C.F., and De Clerck, O. (2012). Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. *Crit. Rev. Plant Sci.* *31*, 1–46.
- Leray, C. (2010). Les lipides dans le monde vivant : Introduction à la lipidomique (Paris: Tec & Doc Lavoisier).
- Lewis, L.A., and McCourt, R.M. (2004). Green algae and the origin of land plants. *Am. J. Bot.* *91*, 1535–1556.
- Li, Y., and Qin, J.G. (2005). Comparison of growth and lipid content in three *Botryococcus braunii* strains. *J. Appl. Phycol.* *17*, 551–556.
- Lidén, G. (2002). Understanding the bioreactor. *Bioprocess Biosyst. Eng.* *24*, 273–279.
- Liu, B.-H., and Lee, Y.-K. (2000). Secondary carotenoids formation by the green alga *Chlorococcum* sp. *J. Appl. Phycol.* *12*, 301–307.
- Lupi, F.M., Fernandes, H.M.L., Tome, M.M., Sá-Correia, I., and Novais, J.M. (1994). Influence of nitrogen source and photoperiod on exopolysaccharide synthesis by the microalga *Botryococcus braunii* UC 58. *Enzyme Microb. Technol.* *16*, 546–550.
- Martin, W. (2010). Evolutionary origins of metabolic compartmentalization in eukaryotes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *365*, 847–855.
- Masojídek, J., Torzillo, G., and Koblížek, M. (2013). Photosynthesis in Microalgae. In *Handbook of Microalgal Culture*, A.R.P.D. Emeritus, and Q.H. Ph.D, eds. (John Wiley & Sons, Ltd), pp. 21–36.
- Masters, M.J. (1971). The occurrence of *Chytridium marylandicum* on *Botryococcus braunii* in School Bay of the Delta Marsh. *Can. J. Bot.* *49*, 1479–1485.

- Mattox, K.R., and Stewart K.D. (1984). Classification of the green algae: a concept based on comparative cytology. In *Systematics of the Green Algae*, (London: Academic Press), pp. 29–72.
- Maxwell, J.R., Douglas, A.G., Eglinton, G., and McCormick, A. (1968). The Botryococcenes—hydrocarbons of novel structure from the alga *Botryococcus braunii*, Kützing. *Phytochemistry* 7, 2157–2171.
- Metzger, P. (1993). *n*-heptacosatrienes and tetraenes from a bolivian strain of *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry* 33, 1125–1128.
- Metzger, P. (1994). Phenolic ether lipids with an *n*-alkenylresorcinol moiety from a bolivian strain of *Botryococcus braunii* (A race). *Phytochemistry* 36, 195–212.
- Metzger, P., and Casadevall, E. (1989). Aldehydes, very long chain alkenylphenols, epoxides and other lipids from an alkadiene-producing strain of *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry* 28, 2097–2104.
- Metzger, P., and Casadevall, E. (1991). Botryococcoid ethers, ether lipids from *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry* 30, 1439–1444.
- Metzger, P., and Largeau, C. (1999). Chemicals of *Botryococcus braunii*. In *Chemicals from Microalgae*, (London: In Cohen Z.), pp. 205–260.
- Metzger, P., and Largeau, C. (2005a). *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 486–496.
- Metzger, P., and Largeau, C. (2005b). *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 486–496.
- Metzger, P., and Rager, M.-N. (2002). Lycopaneroles H, two high molecular weight ether lipids from *Botryococcus braunii* comprising an α -tocopherol unit. *Tetrahedron Lett.* 43, 2377–2380.
- Metzger, P., Casadevall, E., Pouet, M.J., and Pouet, Y. (1985a). Structures of some botryococcenes: branched hydrocarbons from the b-race of the green alga *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry* 24, 2995–3002.
- Metzger, P., Berkaloff, C., Casadevall, E., and Coute, A. (1985b). Alkadiene- and botryococcene-producing races of wild strains of *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry* 24, 2305–2312.
- Metzger, P., Templier, J., Largeau, C., and Casadevall, E. (1986a). An *n*-alkatriene and some *n*-alkadienes from the A race of the green alga *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry* 25, 1869–1872.
- Metzger, P., David, M., and Casadevall, E. (1986b). Biosynthesis of triterpenoid hydrocarbons in the B-race of the green alga *Botryococcus braunii*. Sites of production and nature of the methylating agent. *Phytochemistry* 26, 129–134.

- Metzger, P., Casadevall, E., and Coute, A. (1988). Botryococcene distribution in strains of the green alga *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry* 27, 1383–1388.
- Metzger, P., Villarreal-Rosales, E., Casadevall, E., and Coute, A. (1989). Hydrocarbons, aldehydes and triacylglycerols in some strains of the arace of the green alga *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry* 28, 2349–2353.
- Metzger, P., Allard, B., Casadevall, E., Berkaloff, C., and Couté, A. (1990). STRUCTURE AND CHEMISTRY OF A NEW CHEMICAL RACE OF BOTRYOCOCCUS BRAUNII (CHLOROPHYCEAE) THAT PRODUCES LYCOPADIENE, A TETRATERPENOID HYDROCARBON1. *J. Phycol.* 26, 258–266.
- Metzger, P., Villarreal-Rosales, E., and Casadevall, E. (1991). Methyl-branched fatty aldehydes and fatty acids in *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry* 30, 185–191.
- Metzger, P., Pouet, Y., Bischoff, R., and Casadevall, E. (1993). An aliphatic polyaldehyde from *Botryococcus braunii* (A race). *Phytochemistry* 32, 875–883.
- Metzger, P., Pouet, Y., and Summons, R. (1997). Chemotaxonomic evidence for the similarity between *Botryococcus braunii* L race and *Botryococcus neglectus*. *Phytochemistry* 44, 1071–1075.
- Metzger, P., Rager, M.-N., and Largeau, C. (2007). Polyacetals based on polymethylsqualene diols, precursors of algaenan in *Botryococcus braunii* race B. *Org. Geochem.* 38, 566–581.
- Metzger, P., Rager, M.-N., and Fosse, C. (2008). Braunicetals: Acetals from condensation of macrocyclic aldehydes and terpene diols in *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry* 69, 2380–2386.
- Murakami, M., and Ikenouchi, M. (1997). The biological CO₂ fixation and utilization project by rite (2)—Screening and breeding of microalgae with high capability in fixing CO₂—. *Energy Convers. Manag.* 38, S493–S497.
- Nonomura, A.M. (1988). *Botryococcus braunii* var. *Showa*.
- Norton, T.A., Melkonian, M., and Andersen, R.A. (1996). Algal biodiversity. *Phycologia* 35, 308–326.
- Not, F., Siano, R., Kooistra, W.H.C.F., Simon, N., Vaultot, D., and Probert, I. (2012). Diversity and Ecology of Eukaryotic Marine Phytoplankton. In *Advances in Botanical Research*, (Elsevier), pp. 1–53.
- Ohmori, M., Wolf, F.R., and Bassham, J.A. (1984). *Botryococcus braunii* carbon/nitrogen metabolism as affected by ammonia addition. *Arch. Microbiol.* 140, 101–106.

- Okada, S., Matsuda, H., Murakami, M., and Yamaguchi, K. (1996). Botryoxanthin A, a member of a new class of carotenoids from the green microalga *Botryococcus braunii* Berkeley. *Tetrahedron Lett.* 37, 1065–1068.
- Parfrey, L.W., Grant, J., Tekle, Y.I., Lasek-Nesselquist, E., Morrison, H.G., Sogin, M.L., Patterson, D.J., and Katz, L.A. (2010). Broadly sampled multigene analyses yield a well-resolved eukaryotic tree of life. *Syst. Biol.* 59, 518–533.
- Plain, N., Largeau, C., Derenne, S., and Couté, A. (1993). Variabilité morphologique de *Botryococcus braunii* (Chlorococcales, Chlorophyta): corrélations avec les conditions de croissance et la teneur en lipides. *Phycologia* 32, 259–265.
- Poole, A.M., and Neumann, N. (2011). Reconciling an archaeal origin of eukaryotes with engulfment: a biologically plausible update of the Eocyte hypothesis. *Res. Microbiol.* 162, 71–76.
- Price, D.C., Chan, C.X., Yoon, H.S., Yang, E.C., Qiu, H., Weber, A.P.M., Schwacke, R., Gross, J., Blouin, N.A., Lane, C., *et al.* (2012). Cyanophora paradoxa genome elucidates origin of photosynthesis in algae and plants. *Science* 335, 843–847.
- Pruvost, J., and Cornet, J.-F. (2012). Knowledge models for the engineering and optimization of photobioreactors. In *Microalgal Biotechnology: Potential and Production*, (Posten, Clemens / Walter, Christian), pp. 181–224.
- Pruvost, J., Van Vooren, G., Cogne, G., and Legrand, J. (2009). Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. *Bioresour. Technol.* 100, 5988–5995.
- Pruvost, J., Cornet, J.F., Goetz, V., and Legrand, J. (2011). Modeling dynamic functioning of rectangular photobioreactors in solar conditions. *AIChE J.* 57, 1947–1960.
- Rager, M.-N., and Metzger, P. (2000). Six novel tetraterpenoid ethers, lycopanerols BG, and some other constituents from the green microalga *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry* 54, 427–437.
- Ranga Rao, A., Raghunath Reddy, R.L., Baskaran, V., Sarada, R., and Ravishankar, G.A. (2010). Characterization of microalgal carotenoids by mass spectrometry and their bioavailability and antioxidant properties elucidated in rat model. *J. Agric. Food Chem.* 58, 8553–8559.
- Ranga Rao, A., Baskaran, V., Sarada, R., and Ravishankar, G.A. (2013). In vivo bioavailability and antioxidant activity of carotenoids from microalgal biomass — A repeated dose study. *Food Res. Int.* 54, 711–717.

- Rao, A.R., Dayananda, C., Sarada, R., Shamala, T.R., and Ravishankar, G.A. (2007). Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresour. Technol.* *98*, 560–564.
- Raymond, J., and Segrè, D. (2006). The effect of oxygen on biochemical networks and the evolution of complex life. *Science* *311*, 1764–1767.
- Reisser, W. (1992). *Algae and symbioses: plants, animals, fungi, viruses, interactions explored* (Biopress Limited).
- Richmond, A., and Hu, Q. (2013). *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology* (John Wiley & Sons).
- Roger, null (1999). Reconstructing Early Events in Eukaryotic Evolution. *Am. Nat.* *154*, S146–S163.
- Russell, M.J., and Hall, A.J. (2006). The onset and early evolution of life. *Geol. Soc. Am. Mem.* *198*, 1–32.
- Saha, D., Testard, F., Grillo, I., Zouhiri, F., Desmaele, D., Radulescu, A., Desert, S., Brulet, A., Couvreur, P., and Spalla, O. (2015). The role of solvent swelling in the self-assembly of squalene based nanomedicines. *Soft Matter* *11*, 4173–4179.
- Sakamoto, K., Baba, M., Suzuki, I., Watanabe, M.M., and Shiraiwa, Y. (2012). Optimization of light for growth, photosynthesis, and hydrocarbon production by the colonial microalga *Botryococcus braunii* BOT-22. *Bioresour. Technol.* *110*, 474–479.
- Salmon, E., Behar, F., Lorant, F., Hatcher, P.G., Metzger, P., and Marquaire, P.-M. (2009). Thermal decomposition processes in algaenan of *Botryococcus braunii* race L. Part 1: Experimental data and structural evolution. *Org. Geochem.* *40*, 400–415.
- Sawayama, S., Inoue, S., and Yokoyama, S. (1994). Continuous culture of hydrocarbon-rich microalga *Botryococcus braunii* in secondarily treated sewage. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *41*, 729–731.
- Schnepf, E., and Koch, W. (1978). Ober den Feinbau der “Olalge” *Botryococcus braunii* Kützing (Chlorococcales). *Bot. Jahrb. Syst* 370–379.
- Senousy, H.H., Beakes, G.W., and Hack, E. (2004). PHYLOGENETIC PLACEMENT OF *BOTRYOCOCCUS BRAUNII* (TREBOUXIOPHYCEAE) AND *BOTRYOCOCCUS SUDETICUS* ISOLATE UTEX 2629 (CHLOROPHYCEAE) 1. *J. Phycol.* *40*, 412–423.
- Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., and Roessler, P. (1998). A look back at the US Department of Energy’s aquatic species program: biodiesel from algae (National Renewable Energy Laboratory Golden).

- Shiflett, A., and Johnson, P.J. (2010). Mitochondrion-related Organelles in Parasitic Eukaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.* *64*, 409–429.
- Shimamura, R., Watanabe, S., Sakakura, Y., Shiho, M., Kaya, K., and Watanabe, M.M. (2012). Development of *Botryococcus* Seed Culture System for Future Mass Culture. *Procedia Environ. Sci.* *15*, 80–89.
- Staunton, J., and Weissman, K.J. (2001). Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat. Prod. Rep.* *18*, 380–416.
- Steiner, J.M., and Löffelhardt, W. (2002). Protein import into cyanelles. *Trends Plant Sci.* *7*, 72–77.
- Sud, M., Fahy, E., Cotter, D., Dennis, E.A., and Subramaniam, S. (2012). LIPID MAPS-Nature Lipidomics Gateway: An Online Resource for Students and Educators Interested in Lipids. *J. Chem. Educ.* *89*, 291–292.
- Summons, R.E., Metzger, P., Largeau, C., Murray, A.P., and Hope, J.M. (2002). Polymethylsqualanes from *Botryococcus braunii* in lacustrine sediments and crude oils. *Org. Geochem.* *33*, 99–109.
- Suzuki, R., Ito, N., Uno, Y., Nishii, I., Kagiwada, S., Okada, S., and Noguchi, T. (2013). Transformation of Lipid Bodies Related to Hydrocarbon Accumulation in a Green Alga, *Botryococcus braunii* (Race B). *PloS One* *8*, e81626.
- Takache, H. (2010). Caractérisation, modélisation de la croissance de *Chlamydomonas reinhardtii* en photobioréacteur et mise en évidence du couplage à l'hydrodynamique. Thèse de doctorat. Université de Nantes.
- Takata, T. (2006). 1-20 Polyrotaxane and Polyrotaxane Network: Supramolecular Architectures Based on the Concept of Dynamic Covalent Bond Chemistry. *Polym. J.* *38*.
- Tanabe, Y., Kato, S., Matsuura, H., and Watanabe, M.M. (2012). A *Botryococcus* Strain with Bacterial Ectosymbionts Grows Fast and Produces High Amount of Hydrocarbons. *Procedia Environ. Sci.* *15*, 22–26.
- Tanoi, T., Kawachi, M., and Watanabe, M.M. (2011). Effects of carbon source on growth and morphology of *Botryococcus braunii*. *J. Appl. Phycol.* *23*, 25–33.
- Tappan, H. (1980). Palaeobiology of plant protists.
- Templier, J., Largeau, C., and Casadevall, E. (1984). Mechanism of non-isoprenoid hydrocarbon biosynthesis in *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry* *23*, 1017–1028.
- Templier, J., Largeau, C., and Casadevall, E. (1991). Biosynthesis of *n*-alkatrienes in *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry* *30*, 2209–2215.

- Thompson, P.A., Guo, M., and Harrison, P.J. (1992). Effects of Variation in Temperature. I. on the Biochemical Composition of Eight Species of Marine Phytoplankton. *J. Phycol.* *28*, 481–488.
- Tornabene, T.G., Holzer, G., and Peterson, S.L. (1980). Lipid profile of the halophilic alga, *Dunaliella salina*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *96*, 1349–1356.
- Van Vooren, G., Le Grand, F., Legrand, J., Cuiné, S., Peltier, G., and Pruvost, J. (2012). Investigation of fatty acids accumulation in *Nannochloropsis oculata* for biodiesel application. *Bioresour. Technol.* *124*, 421–432.
- Vandecasteele, J.-P. (2005). Microbiologie pétrolière: concepts, implications environnementales, applications industrielles (Technip).
- Vazquez-Duhalt, R., and Arredondo-Vega, B.O. (1991). Haloadaptation of the green alga *Botryococcus braunii* (race a). *Phytochemistry* *30*, 2919–2925.
- Verbruggen, H., Maggs, C.A., Saunders, G.W., Le Gall, L., Yoon, H.S., and De Clerck, O. (2010). Data mining approach identifies research priorities and data requirements for resolving the red algal tree of life. *BMC Evol. Biol.* *10*, 16.
- Vercauteren, J. (2011). Plan, formules et illustrations du cours de pharmacognosie - 2ème cycle des études de pharmacie.
- Villarreal-Rosales, E., Metzger, P., and Casadevall, E. (1992). Ether lipid production in relation to growth in *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry* *31*, 3021–3027.
- Volova, T.G., Kalacheva, G.S., and Zhila, N.O. (2003). Specificity of Lipid Composition in Two *Botryococcus* Strains, the Producers of Liquid Hydrocarbons. *Russ. J. Plant Physiol.* *50*, 627–633.
- Wake, L.V., and Hillen, L.W. (1980). Study of a “bloom” of the oil-rich alga *Botryococcus braunii* in the Darwin River Reservoir. *Biotechnol. Bioeng.* *22*, 1637–1656.
- Wake, L.V., and Hillen, L.W. (1981). Nature and hydrocarbon content of blooms of the alga *Botryococcus braunii* occurring in Australian freshwater lakes. *Mar. Freshw. Res.* *32*, 353–367.
- Watanabe, M.M., and Tanabe, Y. (2013). Biology and industrial potential of *Botryococcus braunii*. *Handb. Microalgal Cult. Appl. Phycol. Biotechnol.* Second Ed. 369–387.
- Watanabe, M., Kaya, K., Tanoi, T., Kawachi, M., and Shiho, M. (2011). NOVEL STRAIN CLASSIFIED UNDER *Botryococcus braunii* (Google Patents).
- Watkinson, R.J., and Ratledge, C. (1978). *Developments in Biodegradation of Hydrocarbons* (London: Elsevier Science Ltd).

- Weiss, T.L., Spencer Johnston, J., Fujisawa, K., Sumimoto, K., Okada, S., Chappell, J., and Devarenne, T.P. (2010a). PHYLOGENETIC PLACEMENT, GENOME SIZE, AND GC CONTENT OF THE LIQUID-HYDROCARBON-PRODUCING GREEN MICROALGA *BOTRYOCOCCUS BRAUNII* STRAIN BERKELEY (SHOWA)(CHLOROPHYTA) 1. *J. Phycol.* *46*, 534–540.
- Weiss, T.L., Chun, H.J., Okada, S., Vitha, S., Holzenburg, A., Laane, J., and Devarenne, T.P. (2010b). Raman spectroscopy analysis of botryococcene hydrocarbons from the green microalga *Botryococcus braunii*. *J. Biol. Chem.* *285*, 32458–32466.
- Weiss, T.L., Roth, R., Goodson, C., Vitha, S., Black, I., Azadi, P., Rusch, J., Holzenburg, A., Devarenne, T.P., and Goodenough, U. (2012). Colony Organization in the Green Alga *Botryococcus braunii* (Race B) Is Specified by a Complex Extracellular Matrix. *Eukaryot. Cell* *11*, 1424–1440.
- White, J.D., Somers, T.C., and Reddy, G.N. (1986). The absolute configuration of (-)-botryococcene. *J. Am. Chem. Soc.* *108*, 5352–5353.
- White, J.D., Somers, T.C., and Reddy, G.N. (1992). Degradation and absolute configurational assignment to C34-botryococcene. *J. Org. Chem.* *57*, 4991–4998.
- Woese, C.R., Kandler, O., and Wheelis, M.L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *87*, 4576–4579.
- Wolf, F.R., Nonomura, A.M., and Bassham, J.A. (1985). Growth and Branched Hydrocarbon Production in a Strain of *Botryococcus Braunii* (chlorophyta)1. *J. Phycol.* *21*, 388–396.
- Yang, S., Wang, J., Cong, W., Cai, Z., and Ouyang, F. (2004). Utilization of nitrite as a nitrogen source by *Botryococcus braunii*. *Biotechnol. Lett.* *26*, 239–243.
- Yonezawa, N., Matsuura, H., Shiho, M., Kaya, K., and Watanabe, M.M. (2012). Effects of soybean curd wastewater on the growth and hydrocarbon production of *Botryococcus braunii* strain BOT-22. *Bioresour. Technol.* *109*, 304–307.
- Zhila, N.O., Kalacheva, G.S., and Volova, T.G. (2005). Effect of nitrogen limitation on the growth and lipid composition of the green alga *Botryococcus braunii* Kutz IPPAS H-252. *Russ. J. Plant Physiol.* *52*, 311–319.

Liste des abréviations

%MS	Pourcentage dans la Matière Sèche
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AG	Acide Gras
AGE	Acide Gras Essentiel
AGI	Acide Gras Insaturé
AGPI	Acide Gras Poly-Insaturés
ARNr	Acide RiboNucléique ribosomal
a_s	Surface spécifique éclairée du PBR
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
CID	Carbone Inorganique Dissous
C_{x_t}	Concentration en biomasse au temps $t > t_0$ (g.L^{-1})
D	Taux de dilution (j^{-1})
DHA	DocosaHexaenoic Acid
EPA	EicosaPentaenoique Acid
EPS	Exopolysaccharide
GC	Chromatographie en phase Gazeuse
G_s	Irradiance de saturation
HC	Hydrocarbure
LT	Lipides Totaux
Ma	Millions d'années
MCC	Mécanismes de concentration du carbone
MEP	MéthylErythritol Phosphate
MS	Mass Spectrometry
MVA	Mévalonate
MVI	Mévalonate Indépendant
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate forme réduite
PA	Principe Actif
PBR	Photobioréacteur
PRB-A	Polymères Résistants de <i>Botryococcus braunii</i> de race A

PRB-B	Polymères Résistants de <i>Botryococcus braunii</i> de race B
PSI	PhotoSystème I
PSII	PhotoSystème II
Px	Productivité volumique
Q	Débit de soutirage ($L.j^{-1}$)
RPM	Rotation Par Minute
r_x	Productivité volumique
SAM	S Adenosyl-Methionine
Sx	Productivité surfacique ($g.m^{-2}.j^{-1}$)
TAG	Triacylglycérol
THF	TétraHydroFurane
THP	TétraHydroPyrane
TLS	TriLaminar Sheath (Paroi trilaminaire)
UV	UltraViolet
VLCFA	Very Long Chain Fatty Acid = acides gras à très longues chaînes
V_r	Volume de culture (mL)
μ	Taux de croissance instantané (j^{-1})
μ_d	Taux de croissance exprimé en nombre de doublements (par jour)
τ	Temps de séjour (h)

Liste des figures

Figure 1 : arbre phylogénétique universel distinguant 3 grands domaines du monde vivant : Bacteria, Archaea et Eucarya. Les cyanobactéries sont situées dans le domaine des Bacteria au côté des deux autres groupes de bactéries photosynthétiques (Woese <i>et al.</i> , 1990).....	11
Figure 2 : relation entre les grands groupes d'algues et les principaux groupes d'eucaryotes et corrélation entre l'augmentation dans l'atmosphère et l'évolution de la complexité des organismes vivants (De Clerck <i>et al.</i> , 2012).	12
Figure 3 : relation entre les grands groupes d'algues basée sur des données de phellogène moléculaire avec indications sur l'habitat et la morphologie de chaque sous-groupe (De Clerck <i>et al.</i> , 2012)	13
Figure 4 : Scénario d'évolution des algues en trois grands groupes (Glaucophytes, Rhodophytes, Chlorophytes) suite à l'endocytose d'une cyanobactérie. Des endosymbioses secondaires auraient également eu lieu au cours de l'évolution chez les Rhodophytes et Chlorophytes (Gould, 2012).	14
Figure 5 : structure cellulaire d'une cellule de <i>B. braunii</i> , d'après l'analyse d'une souche de race B (Weiss <i>et al.</i> , 2012).	24
Figure 6 : vues partielles en microscopie optique de deux colonies de <i>B. braunii</i> . Visualisation de l'expulsion des gouttelettes d'huiles de la matrice après une légère pression sur la lamelle (à gauche, Weiss <i>et al.</i> , 2010b; à droite, Watanabe and Tanabe, 2013).....	25
Figure 7 : Image par microscopie électronique d'une colonie de <i>B. braunii</i> (à gauche) et zoom sur une cellule et les couches de polymères de matrice qui l'entourent, désignées par des flèches (Suzuki <i>et al.</i> , 2013).	26
Figure 8 : Evolution supposée de l'organisation d'une colonie. Les divisions successives des cellules regroupent les cellules deux par deux et ajoutent une couche de polymère à la base de chaque cellule (Suzuki <i>et al.</i> , 2013).	26
Figure 9 : vues partielles en microscopie optique d'une colonie de <i>B. braunii</i> . Visualisation par fluorescence, après marquage au Nile Red, des inclusions lipidiques intracellulaires et des lipides extracellulaires (d'après Weiss <i>et al.</i> , 2010b).	28
Figure 10 : Classification des lipides suivant leur structure et leur polarité. Illustration avec quelques exemples de structures. En rouge, les groupes de lipides ayant un fort potentiel pour une utilisation comme biocarburant, soit du fait de leur structure soit de leur abondance dans le milieu naturel	31
Figure 11 : précurseurs principaux de la lignine, polymère qui représente un très grand réservoir de carbone organique.....	39
Figure 12 : structure de l'éthylène.....	44
Figure 13 : structure de l'isoprène (à gauche) et du limonène (à droite), monoterpène à odeur d'orange.....	44
Figure 14 : structure de l'acétylène	45
Figure 15 : structure de l'hopane (C ₃₀ , à gauche) et du β-carotène (C ₄₀).....	47
Figure 16 : structure du pristane (C ₁₉ , à gauche) et du phytane (C ₂₀ , à droite).....	47
Figure 17 : structure du toluène (C ₇ , à gauche) et du benzo(a)pyrène (C ₂₀ , à droite), exemples de HAP.....	48
Figure 18 : exemples de profils d'acides gras de souches de race A : souche 807/1 en bleu (Kalacheva <i>et al.</i> , 2002), souche Austin en rouge (Metzger <i>et al.</i> , 1989), souche du lac Shira en vert (Volova <i>et al.</i> , 2003) ...	50
Figure 19 : C ₂₇ alcadiène (a), C ₂₇ alcatriène (b).....	54
Figure 20 : structure du botryococcène C ₃₀ (a), du squalène C ₃₀ (b) et du tétraméthylsqualène C ₃₄ (c).....	57
Figure 21 : structure du lycopadiène (C ₄₀).....	59
Figure 22 : structure des botryals (m : impair de 15 à 21 ; n : pair de 14 à 20).....	59
Figure 23 : structure d'un aldéhyde macrocyclique (C ₃₄), du tétraméthylsqualène diol (C ₃₄) et du braunicétal résultant de l'association des deux molécules (C ₆₈).....	60
Figure 24 : proposition d'association (non covalente) des braunicétals avec les polyaldéhydes.....	61
Figure 25 : structure des alkylphénols de <i>B. braunii</i>	62
Figure 26 : structures des n-alcènes époxydes.....	63
Figure 27 : structure de l'époxy-tétraméthylsqualène (en haut) et du diépoxy-tétraméthylsqualène (en bas).....	63
Figure 28 : structure de l'époxylycopaène.	63
Figure 29 : motif C ₃₂ du polymère polyaldéhyde	64
Figure 30 : proposition d'extension du polymère des souches de race B et L, par acétalisation de terpènes diols sur le "tissu" polyaldéhydrique (fig.7 dans Metzger 2007).....	65
Figure 31 : structure d'un éther lipide résorcinolique (a) et d'un alcadiényl-O-altriényl éther (b).....	66
Figure 32 : structure de la botryoline (a) et de la braunixanthine I (b).	67
Figure 33 : 4 exemples de lycopanérois, deux lycopanérois I (5a, 5b) et deux lycopanérois J (6a, 6b) (Metzger <i>et al.</i> , 2003)	68

Figure 34 : modèle structural d'un algaenan de race L (Fig. 13 dans Salmon <i>et al.</i> , 2009).....	69
Figure 35 : Schéma du métabolisme des lipides de <i>B. braunii</i> , mettant en évidence les voies communes et spécifiques à chaque race. Souligné en rouge, les composés ayant tendance à s'accumuler dans la biomasse et souvent dosés en proportions élevées (>10 %MS).	73
Figure 36 : Schéma de la photosynthèse avec les réactions photochimiques (réactions claires) et le cycle de Calvin-Benson (réactions sombres) permettant de fixer le carbone inorganique à travers 4 phases successives : (1) phase de carboxylation, (2) phase de réduction, (3) phase de régénération et (4) phase de production.	76
Figure 37 : Relation entre l'atténuation de la lumière reçue (G), la croissance photosynthétique (J_{O_2}) et la profondeur de la culture.	81
Figure 38 : relation entre la lumière absorbée en fonction de la profondeur de culture ($G(z)$), la concentration en biomasse dans le réacteur (C_x) et la productivité volumique ($\langle rx \rangle$). Illustration des trois régimes de fonctionnement d'un PBR : photolimitation (a), luminostat (b), cinétique (c). (Pruvost and Cornet, 2012)	83
Figure 39 : Répartition des différentes espèces carbonatées en fonction du pH à une température de 20°C et une force ionique nulle.	84
Figure 40 : Exemples de systèmes de culture ouverts	86
Figure 41 : Exemples de systèmes de culture clos.....	88
Figure 42 : ordres de grandeur des productivités volumiques et surfaciques en biomasse (t.ha-1.an-1) pour différentes technologies de réacteurs.	89
Figure 43 : évolution typique de la concentration en biomasse C_x d'une culture batch, en fonction du temps et mise en évidence des quatre principales phases de croissance.	91
Figure 44 : évolution de la vitesse de croissance en fonction du temps dans une culture en mode discontinu (« batch ») pour une cyanobactérie (en haut) et une microalgue (en bas) (Pruvost and Cornet, 2012).....	93
Figure 45 : évolution typique de la concentration en biomasse C_x d'une culture continue (chemostat), jusqu'à un équilibre correspondant à la phase stationnaire (avec application d'un taux de dilution faible évitant le lessivage de la culture).	94
Figure 46 : comparaison des productivités volumique en biomasse pour deux flux incidents différents dans le même réacteur (PBR2) et dans deux réacteurs plans différant par leur profondeur (notée ici L_z) sous le même flux incident (ici pour $q_0 = 270 \mu\text{mole.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) (Pruvost and Cornet, 2012).	97
Figure 47 : évolution typique de la biomasse et des HC dans une culture batch de <i>B. braunii</i> (d'après Casadevall <i>et al.</i> , 1985b). L'échelle de temps, en abscisse est donnée à titre indicatif.....	106
Figure 48 : PBR utilisés par Shimamura <i>et al.</i> (2012) pour une production à l'échelle pilote ; <i>a</i> correspond à la combinaison de PBR tubulaires représentant un volume total de 480 L, <i>b</i> correspond au PBR « Dome » de 300L.	111

Liste des tableaux

Tableau 1 : caroténoïdes identifiés dans des souches de races B et L	52
Tableau 2 : présentation de la plupart des souches de race A ayant fait l'objet de publications	53
Tableau 3 : structure des hydrocarbures de race A (Metzger and Largeau, 1999)	54
Tableau 4 : présentation de la plupart des souches de race B ayant fait l'objet de publication	56
Tableau 5 : présentation de la plupart des souches de race L ayant fait l'objet de publications	58
Tableau 6 : Lipides principaux de <i>B. braunii</i> suivant la race de la souche.....	70
Tableau 7 : composition massique (%) de différentes souches de microorganismes photosynthétiques (source GEPEA)	78
Tableau 8 : Tableau récapitulatif des principales technologies de systèmes de culture et leurs données essentielles (Souliès, 2014)	90
Tableau 9 : paramètres de quelques cultures standard, concentration maximale ($C_{x_{max}}$) en biomasse atteinte et pourcentages d'hydrocarbures mesurés.	107
Tableau 10 : résultats de croissance et production de lipides obtenus dans différentes conditions de culture airlift en mode batch.	108
Tableau 11 : résultats de croissance et de production des lipides obtenus en culture en PBR airlift en mode continu (Casadevall <i>et al.</i> , 1985a, 1985b).....	109
Tableau 12 : Différents types de PBR utilisés pour la culture de <i>B. braunii</i>	110
Tableau 13 : résultats de croissance obtenus en PBR airlift en mode semi-continu, dans des conditions de production semi-industrielles (Shimamura <i>et al.</i> , 2012).....	112

Vu, le Président du jury,

Vu, le Directeur de thèse,

Vu, le Directeur de l'UFR,

Moutel Benjamin

Etude de l'intérêt pharmaceutique et d'une production industrielle des lipides issus de la microalgue *Botryococcus braunii*

La microalgue *Botryococcus braunii* est principalement connue pour produire et accumuler de grandes quantités d'hydrocarbures. Elle est pour cela très étudiée comme source potentielle de biocarburant. Elle produit également des lipides originaux qui sont très peu étudiés pour des applications pharmaceutiques. Ce mémoire tente de dresser un panorama des applications potentielles des lipides de *B. braunii* pour l'industrie pharmaceutique. Des activités antioxydantes et antimicrobiennes ont été évoquées dans quelques publications. Néanmoins, les hydrocarbures de *B. braunii* pourraient trouver des applications potentielles et nouvelles en nanomédecine grâce à leurs longues chaînes carbonées et leurs insaturations placées à des positions stratégiques. Elle pourrait également représenter une nouvelle source de biomatériaux biosourcés pour la pharmacie et d'autres secteurs. Le contenu biochimique de cette microalgue demande donc à être exploré mais une production à échelle industrielle de composés d'intérêt par la microalgue elle-même nécessitera d'en maîtriser la culture. Or, *B. braunii* est une espèce particulière également pour sa croissance lente et la variabilité dans son comportement en culture. Ce mémoire présente la biologie de *B. braunii* et les paramètres qui sont les plus influents sur la productivité de ses lipides.

MOTS CLÉS : MICROALGUE, LIPIDE, BOTRYOCOCCUS, HYDROCARBURE, CULTURE, PHOTOBIOREACTEUR

JURY

PRÉSIDENT : M. Alain Pineau, PU-PH (Faculté de Pharmacie de Nantes)

ASSESEURS : Mme Gaëtane Wielgosz-Collin, MCU-HDR (Faculté de Pharmacie de Nantes)

M Olivier Gonçalves, MCU (Université de Nantes)

Benjamin Moutel, 103 avenue Guy de la Morandais 44500 La Baule