

# Thèse de Doctorat

Huu Phuoc Trang NGUYEN

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université de Nantes  
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : VENAM Végétal, Environnement, Nutrition, Agroalimentaire, Mer

Discipline : *Biotechnologies agroalimentaires, sciences de l'aliment*

Spécialité : *Biochimique*

Unité de recherche : *Laboratoire MMS EA 2160*

*Faculté des Sciences et Techniques*

Soutenue le 27 juin 2017

## Optimisation du procédé d'hydrolyse enzymatique appliqué à l'extraction du pigment rouge, la R-phycoérythrine à partir de *Mastocarpus stellatus* et *Gracilaria gracilis*

### JURY

Président du jury :	<b>Thierry MAUGARD</b> , Professeur des Universités, Université de la Rochelle
Rapporteurs :	<b>Fabienne GUERARD</b> , Professeur des Universités, Université de Bretagne Occidentale, Brest <b>Thierry MAUGARD</b> , Professeur des Universités, Université de la Rochelle
Invité :	<b>Isabelle MUSSIO</b> , Maitre de Conférences, Université de Caen Normandie
Directeur de Thèse :	<b>Justine DUMAY</b> , Maitre de Conférences, HDR, Université de Nantes
Co-directeur de Thèse :	<b>Joël FLEURENCE</b> , Professeur des Universités, Université de Nantes
Encadrant de Thèse :	<b>Michèle MORANÇAIS</b> , Maitre de Conférences, Université de Nantes



## Remerciements

*Cette thèse a été réalisée à Laboratoire Mer, Molécules, Santé (MMS) de Nantes (EA 2160), sur le site de la 'Faculté des Sciences et des Techniques', au sein de l'équipe "ChiChamva".*

*Tout d'abord je tiens à remercier Joël Fleurence, Professeur à l'Université de Nantes, pour m'avoir proposée ce sujet, de m'avoir accueillie au sein du Laboratoire Mer, Molécules, Santé et d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse pendant 3 ans. Tes conseils et ton soutien ont contribué à la réalisation de ma thèse.*

*Un grand merci également à Justine Dumay, Maître de Conférence-HDR à l'Université de Nantes d'avoir accepté d'être ma co-directrice de thèse avec efficacité et enthousiasme. Merci pour ton écoute, tes encouragements et ta patience pendant ce travail de thèse. Tu m'as beaucoup aidée dans la correction de cette thèse et en conseils linguistiques.*

*Un grand merci également à Michèle Morançais, Maître de conférence à l'Université de Nantes d'avoir accepté d'encadrer ce travail. Je te remercie sincèrement pour ton encouragement, ta patience, de m'avoir transmis tes connaissances, effectué les corrections de ma thèse et donné des conseils linguistiques.*

*Je tiens à remercier le Professeur Thierry Maugard et le Professeur Fabienne Guerard d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse en tant que rapporteurs.*

*Je remercie également Isabelle Mussio, Maître de conférence à l'Université de Caen Normandie d'avoir accepté d'être membre de ce jury de thèse.*

*Je remercie également Anne-Marie Rusig et Erwan Ar Gall d'avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse et me soutenir pendant ces années.*

*Je remercie sincèrement Paul Déléris pour son aide sur l'électrophorèse ainsi que de m'avoir transmis ses connaissances.*

*Je remercie également Claire à l'IFREMER et Matthieu pour leur aide dans les analyses de protéines et lipides.*

*Je tiens à remercier tout le personnel du laboratoire MMS pour leur aide ainsi que pour leur accueil. Merci à Alexandra Patoux pour ton aide administrative et ta gentillesse.*

*Je remercie sincèrement Yves David et Paul Desmottes pour votre aide de relecture de mes écrits français, de vos encouragements et de votre gentillesse.*

*Enfin, un immense merci à tous mes proches, ma famille, mes amies, pour leur soutien, leur aide et leur patience. Merci à Mathilde, Nuria, Antony, Astrid, Cécile, Marta, Laurent, Alexandra, Tú, Trang, Lân, Ngọc, Duyên, Sơn, Nam. Merci à tous de votre présence à mes côtés ainsi que de vos aides pendant plus de trois ans.*

***Merci!***

## Publications

### Articles:

2015: “Extraction and Purification of R-phycoerythrin from Marine Red Algae”. Justine Dumay, Michèle Morançais, Huu Phuoc Trang Nguyen, Joël Fleurence. *Methods in molecular biology*, Soumis Juin 2015.

2016: “*Mastocarpus stellatus* as a source of R-phycoerythrin: optimization of enzyme assisted extraction using response surface methodology”. Huu Phuoc Trang Nguyen, Michèle Morançais, Joël Fleurence, Justine Dumay. *Journal of Applied Phycology*, doi:10.1007/s10811-016-1024-z. (Chapitre II).

### Congrès Internationaux:

2016, Communication orale: “Enhancement of R-phycoerythrin extraction from *Mastocarpus stellatus* by the use of enzymatic hydrolysis”. Huu Phuoc Trang Nguyen, Michèle Morançais, Joël Fleurence, Justine Dumay. Oceanext 2016, du 8 au 10 Juin 2016 à Nantes, France.

Proceedings: <https://oceanext.sciencesconf.org/file/212623>

# Sommaire

Remerciements .....	1
Publications .....	3
Liste des figures.....	7
Liste des tableaux .....	11
Abréviation .....	13
Introduction Générale.....	18
CHAPITRE I : Étude bibliographique .....	24
1. Les Rhodophytes.....	24
1.1. Généralités .....	24
1.2. Caractéristiques biochimiques des macroalgues rouges.....	25
1.3. Valorisation des Rhodophytes .....	31
2. Description générale du modèle d'étude <i>Mastocarpus stellatus</i> .....	37
2.1. Généralités .....	37
2.2. Cycle de vie .....	38
2.3. Composition biochimique de <i>Mastocarpus stellatus</i> .....	39
2.4. Applications .....	40
3. Description générale du modèle d'étude <i>Gracilaria</i> sp.....	42
3.1. Généralités .....	42
3.2. Cycle de vie .....	44
3.3. Répartition géographique de <i>Gracilaria</i> sp.....	45
3.4. Composition biochimique de <i>Gracilaria</i> sp.....	47
4. Phycobiliprotéines et R-phycoérythrine.....	52
4.1. Les phycobiliprotéines.....	52
4.2. Le phycobilisome.....	54
4.3. La phycoérythrine .....	57
4.4. Facteurs influençant la composition en pigments accessoires.....	60
4.5. Valorisation de la R-phycoérythrine.....	61
4.6. Les méthodes d'extraction de la R-phycoérythrine .....	62
4.7. Extraction assistée par hydrolyse enzymatique .....	64
4.8. Optimisation des hydrolyses.....	72

4.9. Les méthodes de purification de la R-phycoérythrine .....	75
Chapitre II : <i>Mastocarpus stellatus</i> (Stackhouse) Guiry comme une source de R-phycoérythrine : Optimisation de l'extraction assistée par hydrolyse enzymatique en utilisant la méthodologie des surfaces de réponse.....	82
1. Contexte de l'étude .....	82
2. Composition biochimique de <i>Mastocarpus stellatus</i> .....	83
2.1. Matériel et méthodes.....	83
2.2. Composition biochimique.....	87
3. Conditions d'extraction de la R-phycoérythrine de <i>Mastocarpus stellatus</i> .....	88
3.1. Influence du ratio masse de poudre algale/volume eau de ville et durée d'extraction .....	88
3.2. Influence du nombre d'extraction.....	89
4. <i>Mastocarpus stellatus</i> (Stackhouse) Guiry as a source of R-phycoerythrin: Optimization of enzyme assisted extraction using response surface methodology ..	91
4.1. Abstract.....	91
4.2. Introduction.....	92
4.3. Materials and Methods .....	94
4.4. Results.....	96
4.5. Discussion.....	105
4.6. Conclusion .....	107
4.7. Acknowledgement .....	108
5. Conclusion.....	109
Chapitre III : Comparaison des différentes méthodes d'extraction de la R-phycoérythrine de <i>Gracilaria gracilis</i> et optimisation des conditions d'hydrolyse ...	113
1. Contexte de l'étude .....	113
2. Composition biochimique .....	113
2.1. Matériel et méthodes.....	113
2.2. Composition biochimique.....	114
3. Extraction de la R-phycoérythrine par macération classique .....	115
3.1. Rapport masse d'algue et volume d'eau .....	115
3.2. Durée d'extraction de la R-PE .....	116
4. Comparison of different methods for the extraction of R-phycoerythrin from <i>Gracilaria gracilis</i> and optimization of hydrolysis conditions.....	116

4.1. Abstract.....	116
4.2. Introduction.....	117
4.3. Materials and methods.....	119
4.4. Results.....	123
4.5. Discussion.....	132
4.6. Conclusion.....	134
4.7. Acknowledgement.....	135
5. Conclusion.....	136
Chapitre IV : Purification de la R-phycoérythrine à partir d'algue rouge <i>Gracilaria gracilis</i> par chromatographie échange d'anion.....	140
1. Contexte de l'étude.....	140
2. Purification of R-phycoerythrin from a marine Macroalga <i>Gracilaria gracilis</i> by Anion - Exchange Chromatography.....	141
2.1. Abstract.....	141
2.2. Introduction.....	141
2.3. Material and methods.....	143
2.4. Results.....	146
2.5. Discussion.....	154
2.6. Conclusion.....	155
2.7. Acknowledgement.....	155
3. Conclusion.....	155
Conclusion générale.....	159
Références bibliographiques.....	161
Annexe.....	190



## Liste des figures

No	Liste des figures	Pages
1	Les algues rouges : <i>Grateloupia turuturu</i> (Garnier 2017) ; <i>Palmaria palmata</i> ; <i>Chondrus crispus</i> ; <i>Mastocarpus stellatus</i> ; <i>Gracilaria gracilis</i> (Guiry 2016)	24
2	Représentation schématique de la paroi des macroalgues rouges (Jouanneau 2015)	27
3	Les groupes de carraghénanes : carraghénane kappa (k), carraghénane iota (i) et carraghénane lambda ( $\lambda$ ) (Patel 2014)	28
4	Exemples de produits alimentaires à base d'algues rouges	31
5	Exemples de produits alimentaires de Nori (Zomato 2016)	32
6	Photographies des thalles de <i>Mastocarpus stellatus</i> collectés au printemps à Batz-sur-Mer	37
7	Cycle de vie de <i>Mastocarpus stellatus</i> (Ludington 1999)	38
8	Structure chimique des carraghénanes	41
9	Différentes espèces du genre <i>Gracilaria</i> : <i>G.gracilis</i> (Récolté en 2015) ; <i>G.crassa</i> (Sudhaka et al. 2015) ; <i>G.mammillaris</i> (Jeff 2016) ; <i>G.Tikvahiae</i> , <i>G.confervoides</i> , <i>G.coronopifolia</i> (Deane 2016) ; <i>G.salicornia</i> (Keoki et Stender 2016) ; <i>G.parvaspora</i> , <i>G.chilensis</i> (Schloss et al. 2016)	43
10	Représentation schématique du cycle de la vie de <i>Gracilaria</i> sp. (Oliveira et Plastino 1994)	45
11	Distribution mondiale de <i>Gracilaria</i> sp. (Inaturalist 2015)	46
12	Production aquacole mondiale de <i>Gracilaria</i> sp. (FAO 2014)	46
13	Motifs structuraux polysaccharides d'agar montrant la numérotation de carbone (C1-C6) (Francavilla et al. 2013b)	50
14	Structure chimique des différents chromophores (Glazer 1988)	54
15	Organisation schématique d'un phycobilisome hémidiscoïdal,	56

	présentant un domaine central à trois éléments cylindriques (Ducret et al. 1996) ainsi qu'organisation moléculaire du domaine central et des bâtonnets d'un phycobilisome (Richter 1993)	
16	Spectre d'absorbance (en rose) et spectre de fluorescence (vert, excitation à 498 nm) caractéristiques de la R-PE (Munier 2013)	58
17	Structure des Phycoérythrines (Dumay et al. 2014)	59
18	Schématisation de la réaction enzymatique : E (enzyme), S (substrat) et P (produit) (Anne 2012)	64
19	Structure de la cellulose et son hydrolyse en monomères de glucose	66
20	Structure du xylane et son hydrolyse en xylose	67
21	Structure de $\beta$ -glucane et son hydrolyse en $\beta$ -(1-3) glucose	68
22	Influence de la température sur la réaction enzymatique (Moussard 2006)	69
23	Variation de la vitesse de réaction enzymatique en fonction du pH (Cuvellier 1999)	69
24	Effet de la concentration en enzyme sur la quantité de substrat formé au cours du temps (A) et sur la vitesse de réaction (B) (Cuvellier 1999)	72
25	Plan composite pour l'étude de trois facteurs en trois dimensions. Les points factoriels sont en noir, les pointes en étoile sont en vert, les points centraux sont en rouge (d'après Goupy 1999)	74
26	<i>Mastocarpus stellatus</i> récoltée et congelée	83
27	Gamme étalon du dosage des protéines hydrosolubles par la méthode de Bradford	85
28	Gamme étalon du dosage des sucres hydrosolubles par la méthode de Dubois	86
29	Rendement d'extraction en R-PE et IP moyens selon différents rapports masse de poudre algale/volume eau et durée d'extraction à partir de l'algue <i>Mastocarpus stellatus</i>	89
30	Spectres des surnageants de la 1 <sup>ère</sup> extraction (n=1 en rouge), de la 2 <sup>ème</sup>	90

	extraction (n=2 en vert), de la 3 <sup>ème</sup> extraction (n=3 en bleue), de la 4 <sup>ème</sup> extraction (n=4 en jaune) à partir de l'algue <i>Mastocarpus stellatus</i>	
31	Water-soluble protein, and R-PE extraction yields and R-PE Purity Index (PI) of <i>Mastocarpus stellatus</i> after maceration in tap water (TW), pure water (PW), phosphate buffer 50 mM, pH 6.45 (pH 6.45), phosphate buffer 0.1 M, pH 6.5 (pH 6.5), and phosphate buffer 20 mM, pH 7.1 (pH 7.1)	97
32	Effect of pretreatment methods and enzymatic hydrolysis on the protein content of <i>Mastocarpus stellatus</i> . Dry weight =33.3% of wet algae (unpublished data). a: water-soluble proteins (mg g <sup>-1</sup> dw); b: R-PE yield (mg g <sup>-1</sup> dw); c: R-PE Purity Index (PI)	99
33	Predicted response surfaces according to pH, enzyme and temperature parameters. A: R-PE yield (mg g <sup>-1</sup> dw) as a function of pH and enzyme/substrate ratio; B: RPE yield (mg g <sup>-1</sup> dw) as a function of temperature and enzyme/substrate ratio; C: R-PE yield (mg g <sup>-1</sup> dw) as a function of temperature and pH.	103
34	<i>Gracilaria gracilis</i> : protocol for the extraction of R-phycoerythrin	120
35	Experimental apparatus to study enzymatic hydrolysis	121
36	Effect of algal treatment and enzymatic hydrolysis on water-soluble protein (A), R-PE extraction yields (B), PI Purity Index (C) of <i>Gracilaria gracilis</i>	126
37	Estimated response surfaces according to hydrolysis time, enzyme and temperature parameters. A: R-PE yield (mg g <sup>-1</sup> dw) as a function of hydrolysis time and enzyme/substrate ratio. B: R-PE yield (mg g <sup>-1</sup> dw) as a function of temperature and enzyme/substrate ratio. C: R-PE yield (mg g <sup>-1</sup> dw) as a function of temperature and hydrolysis time	130
38	Scheme for R-phycoerythrin extraction and purification procedure from <i>Gracilaria gracilis</i>	144
39	Absorbance spectrum of the crude extract of <i>Gracilaria gracilis</i>	146
40	Gel filtration chromatogram is of the crude extract (CE) from	147

	<i>Gracilaria gracilis</i>	
41	<p>Purification step of the CE by anion exchange HPLC on DEAE Sepharose. Chromatograms were monitored by UV-visible spectrophotometry at 280 (-----) and 565 (——). NaCl concentration (.....). The fractions were eluted at:</p> <p>A: AE-150/AE-200/AE-1000  B: AE-150/AE-250/AE-1000  C: AE-150/AE-300/AE-1000</p>	148
42	<p>Absorbance spectra of fractions: A (AE-150, AE-200, AE-1000); B (AE-150, AE-250, AE-1000); C (AE-150, AE-300, AE-1000), obtained after the purification step</p>	151
43	<p>Gel filtration chromatograms of fractions: A (AE-150, AE-200, AE-1000); B (AE-150, AE-250, AE-1000); C (AE-150, AE-300, AE-1000), obtained after the purification step</p>	152
44	<p>SDS-PAGE analysis of CE and the fractions obtained after purified. Lane 1: Molecular weight markers. Lane 2: CE of <i>Gracilaria gracilis</i>. Lane 3, 4 and 5: protein fractions AE-150, AE-200, AE-1000, respectively, from anion-exchange chromatography</p>	153

## Liste des tableaux

No	Liste des tableaux	Pages
1	Principaux nutriments présents dans les algues rouges couramment utilisés dans le monde pour la consommation humaine (Jaspars et Folmer 2013)	33
2	Algues rouges autorisées pour la consommation en France (CEVA 2014)	34
3	Propriétés biologiques de certains composés d'algues rouges	36
4	Composition biochimique de <i>Mastocarpus stellatus</i> (Gómez-Ordóñez et al. 2010; Marsham et al. 2007)	40
5	Composition en acides aminés de <i>Mastocarpus stellatus</i> (Munda et Gubensek 1976)	40
6	Paramètres de marché pour l'agar dans le monde (FAO 2014)	47
7	Composition biochimique de différentes espèces de <i>Gracilaria</i>	49
8	Composition biochimique de <i>Gracilaria gracilis</i> , synthèse de différentes saisons (Francavilla et al. 2013 a)	50
9	Les teneurs en APC, PC et PE pour différentes espèces de <i>Gracilaria</i> (mg g <sup>-1</sup> MS)	60
10	Calcul du niveau des facteurs utilisés pour la réalisation des plans d'expériences	75
11	Techniques de purification de la R-PE de plusieurs espèces d'algues rouges et IP obtenus (Dumay et al. 2014 ; Munier et al. 2015)	78
12	Composition biochimique de <i>Mastocarpus stellatus</i>	87
13	Rendement en R-PE au fil des extractions à partir de l'algue <i>Mastocarpus stellatus</i>	90
14	Hydrolysis conditions and responses for sugar, water-soluble protein, and R-PE contents and purity index obtained for the central composite design. Pink lines correspond to central points	100

15	Values predicted statistically according to optimal conditions and values obtained after validation	102
16	Summary of the results for water-soluble protein extraction yield, R-PE extraction yield, and R-PE Purity Index (PI)	105
17	Composition biochimique de <i>Gracilaria gracilis</i>	114
18	Rendement d'extraction en R-PE et IP moyens obtenus selon différentes rapports masse de poudre algale/volume d'eau de ville à partir de l'algue <i>Gracilaria gracilis</i>	115
19	Rendement d'extraction en R-phycoérythrine et IP moyens obtenus selon différentes durées d'extraction à partir de l'algue <i>Gracilaria gracilis</i>	116
20	R-PE extraction yield, R-PE Purity Index (PI) and water-soluble protein content of <i>Gracilaria gracilis</i> after maceration in different types of extraction solutions	123
21	Experimental design levels of independent variables used in the hydrolysis of <i>Gracilaria gracilis</i> with cellulase	127
22	Hydrolysis conditions and responses for R-PE contents, purity index, water-soluble proteins and total sugars obtained for the central composite design	127
23	Values predicted statistically according to the optimal conditions and values obtained after the validation	129
24	Summary the results for R-PE extraction yield. R-PE Purity Index (PI), water-soluble protein extraction yield using the different extraction methods from dry algae	132
25	The values of spectrophotometric purity and R-PE yield of different fractions: crude extract (CE) of <i>Gracilaria gracilis</i> and anion-exchange chromatography fractions (AE) obtained after the purification	150

## Abréviation

Abréviation	
A	Absorbance
APC(s)	Allophycocyanine(s)
AG	Acide gras
AGMI	Acide gras monoinsaturé
AGPI	Acide gras polyinsaturé
B-PE	B-Phycoérythrine
CEVA	Centre d'Étude et de Valorisation des Algues
Da	Dalton
dw	dry weight
E	Enzyme
EC	Enzyme classification
EI	Chromatographie échange d'ions
FAO	Food and Agriculture Organisation
fw	fresh weight
GF	Chromatographie de gel filtration
h	Heure
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
IP	Indice de Pureté
kDa	Kilo Dalton
MF	Matière Fraiche
min	Minutes
MS	Matière Sèche
MSR	Méthodologie surfaces des réponse

PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PBP(s)	Phycobiliprotéine(s)
PC(s)	Phycocyanine(s)
PEB(s)	Phycoerythrobiline(s)
pI	Point isoélectrique
PUB(s)	Phycourobiline(s)
PXB(s)	Phycobilivioline(s)
T	Température
RMS	Response surface methodologie
R-PE	R-phycoérythrine
R-PC	R-phycocyanine
SAB	Serum albumine bovine
SDS	Sodium dodecylsulfate





# **Introduction Générale**



## Introduction Générale

Les algues sont présentes dans tous les océans du globe. Elles sont constituées d'organismes très divers, allant du phytoplancton microscopique à des algues pouvant mesurer jusqu'à 100 mètres (*Macrocystis pyrifera*) (Pérez 1997). Elles sont une source considérable de molécules d'intérêt puisque 25 % des molécules marines identifiées en sont issues et restent à ce jour une ressource disponible en très grande quantité (Kijoa et Sawangwong 2004). Diverses espèces sont utilisées pour l'alimentation humaine, l'agriculture ou l'industrie. Leur richesse en protéines (jusqu'à 47 % du poids sec) peut être comparée à d'autres aliments riches en protéines comme les sources végétales le soja (30 %), la viande bovine (25 %) ou le saumon (20 %) (Fleurence 1999 b). Les algues ont été consommées depuis des siècles par certaines populations. Traditionnellement consommées en Asie du sud-est comme au Japon où elles sont cultivées depuis le IV<sup>ème</sup> siècle (McHugh 2003), les algues sont encore très discrètes dans les assiettes des consommateurs occidentaux. En Europe, l'introduction d'algues dans l'alimentation humaine a commencé au 15<sup>ème</sup> siècle, en particulier par les populations littorales qui souffraient de la famine (Fleurence 2016). En France, ce n'est qu'au début des années 90 que certaines algues marines ont été autorisées pour la consommation en tant que «légumes» de mer (Fleurence 1991) alors que depuis 40 ans, l'industrie alimentaire tire profit des qualités des algues en tant qu'additifs alimentaires dans la fabrication de diverses préparations culinaires. Pour ces raisons, les algues constituent une biomasse importante pour la recherche et l'identification de métabolites d'intérêt. Depuis peu, les algues sont exploitées comme une ressource pour la production de légumes de mer, les additifs alimentaires, et des suppléments nutritionnels en Asie, en Europe, du Nord et du Sud Amérique, en Afrique et des îles du Pacifique. La production annuelle d'algues destinées à la consommation humaine directe (légume de la mer) ou indirecte (phycocolloïdes) est estimée à 2 000 000 tonnes (matière sèche). Quatre-vingt-dix pour cent de la production vient de la Chine (pour presque 50%), l'Indonésie et les Philippines. La France est seulement en 24<sup>ème</sup> place avec 300t (FAO 2014). En Europe, 95 % des algues commercialisées sont

récoltées à partir des ressources sauvages. En général, les algues sont incluses dans la catégorie "nouveaux aliments" de la réglementation européenne.

Les algues contiennent de nombreux pigments originaux qui ne sont pas présents dans les plantes terrestres. Par exemple, les algues marines rouges contiennent des phycobiliprotéines. Celles-ci comprennent, la R-phycoérythrine, la R-phycoocyanine et l'allophycoocyanine. La R-phycoérythrine est un pigment rouge qui s'extrait facilement avec de l'eau. Elle est utilisée comme colorant alimentaire (chewing-gum, produits laitiers, gelées ...) ou cosmétique tels que le rouge à lèvres et les eyeliners au Japon, en Thaïlande et en Chine. La R-phycoérythrine constitue également une alternative aux colorants de synthèses soupçonnés de provoquer de nombreux effets néfastes sur la santé humaine (carcinogènes, génotoxiques, neurotoxiques ...) (Kobylewski et Jacobson 2010). Purifiée, la R-phycoérythrine peut aussi intéresser les domaines de la biotechnologie pour être utilisée en tant que marqueur fluorescent en cytométrie de flux, dosages immunologies.

L'extraction de la R-phycoérythrine peut s'effectuer à partir d'algues fraîches, d'algues sèches, d'algues lyophilisées et cryobroyées (Orta-Ramirez et al. 2000 ; Denis et al. 2009 b ; Munier et al. 2013 ; Senthilkumar et al. 2013). Jusqu'à présent, il existe de nombreuses méthodes différentes pour obtenir de la R-PE. La macération d'algues est une procédure classique d'extraction. La macération se fait dans de l'eau, dans un tampon phosphate ou acétate (Munier 2013). Les autres techniques sont basées sur une destruction cellulaire d'algues comme le broyage après congélation (Glazer et al. 1971). L'hydrolyse enzymatique est basée sur la dégradation de la paroi cellulaire par des enzymes. Parmi les techniques d'extraction alternatives, cette méthode a déjà montré son intérêt (Fleurence et al. 1995 ; Denis et al. 2009 c ; Dumay et al. 2013).

La valeur de la R-phycoérythrine dépend de son degré de pureté. Les méthodes de purification sont essentiellement des méthodes chromatographiques : la chromatographie d'échange d'ions et la chromatographie de gel filtration (Munier et al. 2015). Ce procédé sera développé dans le chapitre IV pour la purification de la R-PE. *Mastocarpus stellatus* et *Gracilaria gracilis* sont deux espèces utilisées pour extraire les carraghénanes et l'agar, respectivement. Certaines études ont amorcé les travaux portant sur l'extraction de la R-phycoérythrine à partir de *Gracilaria gracilis*

sans avoir abordé la question de la purification (Fleurence et al. 1995 ; Mensi et al. 2012). Cependant, il n'y a pas encore d'études portant sur l'extraction de la R-PE de *Mastocarpus stellatus*.

Le chapitre I présente une synthèse bibliographique sur les algues rouges et leurs valorisations, plus particulièrement sur les modèles d'étude *Mastocarpus stellatus* et *Gracilaria gracilis*. Les méthodes d'extraction et de purification du pigment R-phycoérythrine à partir d'algues rouges sont également présentées dans ce chapitre.

Le chapitre II présente l'étude de la composition biochimique et l'influence des méthodes d'extraction (macération traditionnelle ou extraction assistée par hydrolyse enzymatique) pour l'obtention de la R-phycoérythrine de *Mastocarpus stellatus*. Les conditions d'extraction seront optimisées en utilisant la méthodologie des plans d'expériences et en faisant varier les principaux paramètres (pH, température et concentration en enzyme).

Dans le chapitre III, la composition biochimique de *Gracilaria gracilis* a été déterminée. Deux méthodes de prétraitement de l'algue (les algues humides décongelées et les algues lyophilisées cryobroyées) ont été étudiées. Puis la méthode d'extraction conventionnelle a été comparée avec l'extraction assistée par enzyme. Les résultats de l'étude de l'optimisation des conditions d'hydrolyse pour améliorer le rendement de la R-phycoérythrine de *Gracilaria gracilis* par la méthodologie de surface de réponse sont présentés dans ce chapitre.

Dans le chapitre IV, après extraction de la R-phycoérythrine de *Gracilaria gracilis*, le protocole mis en œuvre par Munier et al. (2015) a été adapté pour la purification de la R-PE de *Gracilaria gracilis*.