

Sources connues et potentielles de DHA pour les besoins de l'homme

Gilles BARNATHAN

Laboratoire de Chimie marine,
Groupe Substances marines à activité biologique
EA 2160, Faculté de Pharmacie,
Pôle Mer et Littoral, Université de Nantes,
2 rue de La Houssinière BP 92208 F-44200
Nantes Cedex 3
<Gilles.Barnathan@univ-nantes.fr>

Le DHA, une molécule aux multiples applications et un enjeu pour le XXI^e siècle

Le rôle important joué par les acides gras polyinsaturés (AGPI) à longue chaîne n-3 (ou oméga-3/ ω 3), principalement EPA (acide *all-cis*-5,8,11,14,17-eicosapentaénoïque ou 20 :5 n-3/20 :5 ω 3) et DHA (acide *all-cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexaénoïque ou 22:6 n-3/22 :6 ω 3), en santé et nutrition humaine est désormais bien reconnu, abondamment documenté surtout depuis les années 1990, et les investigations en cours pourraient encore élargir les domaines biologiques concernés. Cependant, le concept d'acide gras (AG) essentiel était récemment encore sujet à discussion [5, 6]. Les effets bénéfiques sur la santé sont nombreux, depuis la réduction du risque cardiovasculaire jusqu'à la prévention du cancer [1-18]. Une récente mise au point rassemble les résultats des études chez l'homme, relatives aux effets de la prise d'AGPI d'huiles de poisson sur les maladies cardiaques et en particulier l'arythmie cardiaque [9].

Considéré comme nutriment essentiel, le DHA est nécessaire au développement normal et fonctionnel des cellules, et joue un rôle crucial dans divers processus et fonctions biochimiques [6-17]. Sa nature polyinsaturée lui confère une importance cruciale vis-à-vis des propriétés de la membrane cellulaire, chez les végétaux comme chez les animaux : fluidité, flexibilité et perméabilité sélective permettant par exemple une adaptation effective, et même la survie, aux basses températures en particulier chez les poissons [20-23]. Le DHA est un constituant structurel majeur du cerveau humain et il en est

Abstract: This paper focuses on the production of docosahexaenoic acid (DHA; 22:6 n-3), a major ω 3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) with applications in foods and pharmaceuticals. Fish oils are currently the main source of PUFA including EPA and DHA. Growing interest in PUFA properties in various fields coupled with their significance in health and dietary requirements has encouraged searching for more suitable sources of these compounds, specially DHA. Some methods in lipid extracting process now allow to get a better industrial use for fish by-products. An important objective is to find cultivated microbiological sources that delivered DHA but no EPA. Potentialities of marine bacteria, microalgae and marine protists are described. The dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii* seems the most efficient microorganism for the large-scale production of DHA devoid of EPA. The marine protists *Thraustochytrids* offer promising possibilities for DHA and other major PUFA production. *C. cohnii* as well as *Thraustochytrium* and *Schizochytrium* are able to produce large biomass and lipid amounts, and DHA at levels up to 60 %. The first results in the production of n-3 long-chain PUFA in transgenic plants are given.

Key words: docosahexaenoic acid (DHA), fish by-products, marine bacteria, microalgae, polyunsaturated fatty acids (PUFA), transgenic plants, thraustochytrids

le principal AG. Le DHA représente 15-20 % du cortex cérébral (le cerveau d'un adulte contient au moins 20 g de DHA) et 30-60 % de la rétine [1-4, 12-16]. Il est indispensable au développement du système nerveux central et à la fonction rétinienne, par incorporation dans les membranes cellulaires, et joue un rôle capital dans l'acquisition et le maintien satisfaisant des mécanismes de la vision et de la mémoire [11-16]. Une approche multidisciplinaire récente place en vis-à-vis, en particulier, le point de vue biomédical d'une part et d'autre part celui de l'aquaculture [18].

Ces effets avérés expliquent la nécessité d'une alimentation équilibrée garantissant un apport journalier suffisant en DHA et autres AGPI ω 3. Les principales sources alimentaires de DHA sont les poissons, en premier lieu les poissons gras, ceux des eaux profondes, ceux des eaux froides [10, 17, 19, 24-32]. Il s'agit notamment du saumon, de la sardine, du flétan et du thon. Il faut y ajouter, dans une moindre mesure, les mammifères marins, les fruits de mer (mollusques, crustacés) [17], et aussi les œufs et les abats.

En considérant les bénéfices indéniables du DHA pour la santé, et les conséquences graves d'une déficience, des suppléments nutritionnels en AGPI, particulièrement en DHA, sont de plus en plus recommandés, ce qui nécessite le développement d'une capacité de production spécifique à l'échelle industrielle. Les compléments commerciaux en AGPI se font le plus souvent sous forme de triglycérides, mais on trouve aussi occasionnellement, en fonction des cibles visées, des esters éthyliques ou des AG libres.

Les huiles de poisson, source actuelle principale de DHA

Le poisson représente une source majeure de nourriture pour l'homme (protéines, lipides) et sa consommation est recommandée pour ses effets bénéfiques sur la santé. La production mondiale de poissons des pêches de capture et de l'aquaculture a été estimée par la FAO à 130 millions de tonnes en 2002 (exceptée la Chine, le plus gros producteur), 76 % pour la consommation humaine, 24 % pour les huiles et les farines. Cette production s'établissait à 20 millions de tonnes en 1950. Le poisson d'élevage y prend une part croissante [17, 19]. La production mondiale des huiles de poisson, fluctuante en général, a diminué d'environ 40 % en cinq ans, s'établissant en 2004 à 930 000 tonnes [17, 19]. La situation dans l'utilisation de ces huiles a radicalement changé. En effet, la part dévolue à l'aquaculture n'était en 1990 que de 16 %, pour atteindre 57 % en 2000. La part destinée à la consommation humaine est dans le même temps passée de 70 à 31 % [19].

Les poissons les plus couramment utilisés pour la production d'huile sont les suivants : anchois, capelan, morue, hareng, maquereau, menhaden, saumon, sardine. Il s'agit de poissons gras, à partir desquels 90 % des huiles sont produites, et où les lipides sont concentrés principalement sous la peau, autour des intestins et du muscle blanc. Les triglycérides sont le composant majeur de ces huiles. On distingue les poissons gras qui contiennent plus de 5 % de lipides et les poissons très gras avec plus 10 % de lipides, mais les teneurs s'avèrent très variables en fonction de la température ou de l'abondance du phytoplancton. Ainsi, les taux

de lipides de la partie comestible (70 % du poids total en moyenne) varie considérablement : 2-9 % pour le hareng, 2-23 % pour la sardine, 5-14 % pour le menhaden [17, 23-30].

À la différence des autres corps gras, les huiles de poisson contiennent EPA et DHA en proportions élevées, respectivement 14-19 % et 5-10 % en moyenne (jusqu'à 40 % en AG diéniques et polyéniques). Les poissons d'eau douce sont en général capables d'accomplir allongement et désaturation à partir de précurseurs courts (acide alphalinoïque) en EPA et DHA tandis que les poissons marins ne le peuvent pas en raison d'une activité $\Delta 5$ -désaturase très faible ou inexistante [17]. Pour ces derniers, EPA et DHA doivent être apportés par l'alimentation. Dans l'environnement marin, la production de DHA est limitée aux micro-organismes et aux micro-algues photosynthétiques. L'EPA et le DHA des huiles de poissons ont donc principalement pour origine les lipides des micro-algues constituant le phytoplancton [17, 20]. Ces acides gras suivent la chaîne alimentaire qui conduit aux poissons via le zooplancton. Les poissons d'élevage ont donné lieu à de nombreuses publications qui ne peuvent être résumées ici mais qui font un large usage des compléments en AGPI [27]. Les poissons d'eau douce, en dépit d'un contenu en AGPI $\omega 6$ relativement important, mériteraient d'être davantage étudiés, en premier lieu les plus consommés localement ou bien ceux surtout destinés à l'exportation [24, 31, 32].

Un déséquilibre croissant entre l'offre et la demande

Si actuellement les huiles de poissons représentent les principales sources industrielles des AGPI, elles ne peuvent plus faire face durablement à l'augmentation de la demande, en particulier pour le DHA. L'offre est réduite du fait de plusieurs obstacles. Leur contenu en DHA est relativement faible en comparaison de l'EPA. Un autre handicap des huiles réside dans un goût et une odeur particuliers, difficilement compatibles avec certains usages. La demande soutenue pour des huiles de poissons de haute qualité coïncide avec les effets de la surpêche, un contexte de diminution de la production globale d'huile de poisson, et l'instauration de réglementations sur la pêche de plus en plus strictes. Il faut pouvoir assurer la fourniture des produits alimentaires en quantité adéquate pour une population humaine sans cesse croissante. Mais, en même temps, les techniques de pêche se perfectionnent sans cesse et cela provoque un effet d'entraînement de la tendance à la surpêche et conduit à une réduction des espèces les plus intéressantes. La survie de certaines espèces serait même en jeu. Il s'y ajoute

une nette augmentation de leur utilisation en aquaculture et la question de nouvelles sources est abordée dans plusieurs mises au point [17, 20, 33-35]. D'autres difficultés doivent être rappelées : le coût élevé d'extraction des acides gras à partir des chairs de poissons, l'irrégularité de production selon les saisons, la présence de fortes concentrations en cholestérol. D'autre part, la production d'huiles de poisson est montrée du doigt par des groupes de pression écologistes qui veulent prévenir contre les risques de pollution dans l'environnement marin (coextraction de contaminants indésirables, métaux lourds). Certaines espèces sont menacées d'extinction. De plus, la production de ces huiles par de grosses installations industrielles pourrait entraîner des dommages aux écosystèmes marins. Il est devenu nécessaire de se tourner vers des sources alternatives aux huiles de poissons pour la production d'acides gras $\omega 3$ ne possédant pas les inconvénients cités précédemment.

De l'intérêt de produire le DHA sans EPA

Depuis peu, un intérêt considérable est porté à des sources et des procédés de production de DHA exempt d'EPA. L'EPA semble en effet contre-indiqué dans la composition des suppléments nutritionnels pour enfants [17, 20, 36]. Il a été avancé en effet que l'EPA pourrait abaisser le taux d'acide arachidonique chez les enfants, avec des conséquences pour leur développement. Les huiles de poisson sont relativement bon marché mais il est presque impossible de séparer le DHA de l'EPA à partir de cette source.

C'est pourquoi une recherche de nouvelles sources de DHA comme AGPI quasi unique se développe depuis une douzaine d'années, principalement centrée sur les micro-organismes marins.

Puisque EPA et DHA n'ont pas de source vraiment significative autre que l'écosystème marin, c'est naturellement vers les organismes marins que l'on s'est tourné. C'est ainsi que la production des AGPI (n-3) par fermentation de micro-organismes oléagineux a suscité une attention considérable et des applications industrielles avec la production d'huile de cellules isolées (*single-cell oil*). Un large choix de microbes autotrophiques et hétérotrophiques a été soumis à une évaluation comme source potentielle d'EPA et de DHA par plusieurs équipes. Ces travaux ont été passés en revue [37-40].

Le DHA est ainsi devenu, dans le dernier quart du XX^e siècle, une molécule de choix et un sujet de préoccupation pour l'avenir compte tenu du déséquilibre croissant entre l'offre et la demande.

Une source de DHA à développer : déchets et co-produits issus de la pêche Procédés d'enrichissement en EPA et DHA et de séparation EPA/DHA

L'exploitation du poisson génère des co-produits, parties non utilisées et récupérables lors des opérations habituelles de production et représentant 30-60 % du poids du corps : viscères, têtes, peau, chutes de filetage, foies, œufs et laitance. Une estimation de la FAO en 2004 porte ces co-produits à 7 millions de tonnes par an [19]. Il apparaît que les co-produits pourraient être valorisés en produits à plus haute valeur ajoutée que les farines actuellement produites, compte tenu de leur richesse avérée en AGPI, en DHA, et aussi en certains phospholipides d'intérêt [17, 41-48].

Il s'agit en fait d'une source alternative de production de DHA prometteuse puisque mettant en jeu des quantités énormes de matière première pour une valorisation biotechnologique et industrielle. Les voies classiques d'enrichissement en AGPI $\omega 3$, et en DHA, des mélanges d'acides gras disponibles, ainsi que de nouvelles méthodes d'extraction et séparation, prennent alors toute leur importance. Les diverses facettes de l'extraction et de l'enrichissement en EPA et DHA de plusieurs poissons y compris de co-produits ont été décrites, en particulier à l'aide des procédés tels que l'inclusion à l'urée ou la cristallisation sélective à basse température [26, 41-48]. Les analyses des contenus en lipides ont longtemps concerné les parties comestibles (muscles) et le foie du poisson. Plusieurs investigations ont mis en évidence que d'autres parties du poisson, la peau par exemple, souvent écartées pour diverses raisons quand le poisson est préparé pour la consommation, peuvent souvent montrer des taux élevés en EPA et DHA. Par exemple, la peau de certains poissons des eaux sénégalaises contient jusqu'à 7 % de DHA (10 % pour les muscles) ; les raies des pêches artisanales mauritaniennes contiennent des taux élevés de DHA : 2-5 % pour le muscle, et surtout 5-13 % pour le foie et 4-14 % pour les gonades [28-30]. Dans un rapport récent, le muscle, la peau et les viscères du maquereau contiennent des quantités voisines de DHA, de 8 à 10 %, des valeurs qui peuvent être quadruplées par enrichissement par le procédé d'inclusion dans l'urée [49].

L'usage d'enzymes protéolytiques commerciales rend possible une extraction satisfaisante des lipides en réalisant une déstructuration des tissus (par exemple, têtes de saumon, têtes et viscères de sardine) et évite ainsi l'emploi de solvants organiques indésirables pour certaines

Tableau 1. Production de lipides, EPA et DHA par hydrolyse enzymatique de co-produits de poisson.

Procédé d'extraction	Lipides	EPA ^a	DHA ^a
Têtes de saumon ^b			
Solvants organiques	21,5	7,7	11,9
Protamex	19,8	8,4	12,1
Viscères de sardine ^c			
Solvants organiques	18,0	11	17,6
Protamex	25,0	6,6	7,9
Flavourzyme	28,0	5,9	7,1

^a en % des acides gras totaux.

^b Gbobouri [50].

^c Dumay [51, 52].

applications [41-43, 50-52]. Le taux de lipides libérés par le processus enzymatique, et les quantités d'AGPI, DHA et EPA, sont similaires voire supérieurs à ceux des lipides obtenus par extraction classique par solvants organiques (tableau 1).

Le tableau 1 montre des taux élevés en DHA dans les co-produits. Ces résultats, qui restent à transposer à une échelle industrielle, montrent qu'il est possible d'envisager une valorisation des co-produits comme source majeure à venir des AGPI.

Séparation EPA/DHA

Des méthodes chromatographiques ont été décrites pour séparer EPA et DHA, y compris à l'échelle industrielle, et une synthèse en a été publiée en 2004 [41]. Les espèces moléculaires des triglycérides d'une huile de poisson peuvent être séparées par CLHP ce qui permet d'atteindre directement les espèces riches en DHA [42]. Le dioxyde de carbone en phase supercritique a été utilisé en remplacement des solvants organiques classiques pour fractionner EPA et DHA contenus dans les huiles de poisson, sous forme d'esters éthyliques. Un mélange EPA (17 %) et DHA (12 %) issu d'une huile de sardine et traité par cette méthode conduit à obtenir séparément EPA et DHA, avec des concentrations respectives de 58 et 67 %. Cette technique est souvent couplée à l'extraction par complexation à l'urée [43-45]. Ainsi, la proportion en EPA et DHA dans les AG totaux (esters éthyliques) des eaux de cuisson du thon a été portée à 37,4 % par complexation à l'urée, puis à 54,3 % par extraction au dioxyde de carbone en phase supercritique [45].

Des lipases de diverses origines ont été utilisées comme catalyseurs pour séparer DHA et EPA des huiles de poisson en mettant à profit une résolution cinétique basée sur une différence de sélectivité aux AG [41, 46]. L'estérification des AG de plusieurs types d'huiles de poisson avec le glycérol, réalisée avec une lipase isolée de *Rhizomucor miehei* et immobilisée, conduit à une séparation très efficace du DHA de l'EPA. La majeure partie des AG, incluant l'EPA, est

convertie en acylglycérols tandis que le DHA reste dans les AG libres résiduels. À titre d'exemple, quand les AG libres d'une huile de thon contenant 5 % d'EPA et 25 % de DHA sont estérifiés par le glycérol, les AG libres résiduels contiennent près de 80 % de DHA et seulement 3 % d'EPA [46].

Les bactéries marines : des perspectives inattendues

Dans les chaînes trophiques marines, les micro-algues ont été longtemps considérées comme les seules sources *de novo* des AGPI ω3. D'une manière générale, les investigations se sont portées sur les micro-organismes du milieu marin [53, 54]. Il faut ainsi prendre en compte les bactéries qui constituent des producteurs primaires des chaînes marines ainsi que des communautés commensales des animaux marins [55]. Les bactéries marines sont connues pour leur rôle dans le recyclage des nutriments et la dégradation de la matière organique. Des bactéries sont présentes dans tous les environnements marins, soit dans l'eau soit fixées à la surface des objets ou organismes [55]. On a trop longtemps considéré que les membranes bactériennes étaient dépourvues d'AGPI et leur possible production par les bactéries a été trop longtemps négligée [54].

Tableau 2. Production d'acides gras polyinsaturés par des bactéries marines.

Acide gras	<i>Shewanella gelidimarina</i> ^a	<i>Shewanella hanedai</i> ^a	<i>Colwellia psychrerythraea</i> ^a	<i>Vibrio sp.</i> ^b	<i>Vibrio marinus</i> ^c
iso-13 : 0	15,8	6,4	< 1	–	–
14 : 0	4,4	9,3	6,4	11,6	16,4
iso-15 : 0	8,3	8,5	–	–	–
15 : 0	6,7	4,1	6,7	–	–
16 : 0	6,4	13,6	30,0	10,0	12,9
16 : 1	27,4	29,0	33,4	32,9	34,7
20 : 5 n-3	16,0	20,2	0,7	–	–
22 : 6 n-3	–	–	6,8	17,4	17,9

^a Russel & Nichols [54].

^b Henderson [20].

^c Delong & Yayanos [63].

Contrairement à ce qui était admis jusque vers 1990, les travaux de Wada *et al.* ont prouvé que les deux voies de biosynthèse des AGPI, aérobie et anaérobie, peuvent intervenir au sein d'une même espèce, une souche marine *Pseudomonas sp.* qui produit EPA et DHA [56]. Il fallait dès lors concevoir que des bactéries puissent effectivement posséder la capacité métabolique de produire des AGPI et singulièrement du DHA. Diverses souches marines isolées ont été cultivées et sont capables de synthétiser EPA et/ou DHA avec des rendements appréciables. Les bactéries des eaux profondes, ainsi que plusieurs souches (*Pseudomonas*, *Vibrio*, *Moritella*, *Shewanella* et *Colwellia*) sont capables de produire des AGPI ω3 dans les chaînes trophiques (tableau 2) [56-62]. Le genre *Shewanella* produit l'EPA mais pas le DHA. Les souches *Vibrio sp.* et *V. marinus* produisent respectivement 17,4 % et 17,9 % de DHA sans EPA [20, 63].

Certaines bactéries productrices des AGPI vivent en symbiose dans l'intestin de poissons pélagiques assurant ainsi la fourniture de DHA dont l'hôte a besoin lorsque le phytoplancton vient à manquer. Cinq souches bactériennes, en particulier du genre *Vibrio*, isolées de l'intestin de poissons des eaux profondes produisent le DHA à des proportions de 6,4 à 11,6 % des AG totaux lorsqu'elles sont incubées dans un milieu exempt de DHA. Le genre *Vibrio* a été reclassé par la suite en *Colwellia* dont les souches intéressantes sont issues des milieux marins antarctiques [59]. Le DHA était présent à des proportions de 8,1 à 21,5 % chez huit bactéries barophiles facultatives isolées de l'intestin de sept poissons des eaux profondes [62]. Cette étude, portant sur la composition des phospholipides (74 à 83 % des lipides), a montré que le taux de DHA est lié à la pression ambiante ce qui suggère que le DHA joue un rôle majeur dans le maintien de la fluidité de la membrane cellulaire sous haute pression [62]. Des souches du genre *Moritella* produisent le DHA, tandis que les souches *Shewanella* produisent l'EPA et pas de DHA [58, 60, 68].

Dans les cellules des mammifères, la biosynthèse du DHA suit une voie aérobie et implique une double élongation de 20 :5n-3 en 22 :5n-3 puis en 24 :5n-3, suivie d'une Δ6 désaturation conduisant au 24 :6n-3 qui subit une β-oxydation dans les peroxisomes pour donner finalement le DHA 22 :6n-3. Chez certains micro-organismes à la base des chaînes alimentaires marines, la biosynthèse des AGPI passe aussi par un mécanisme aérobie et met en œuvre une Δ4-désaturase qui permet le passage direct du 22 :5n-3 au 22 :6n-3 [17].

Une nouvelle voie de biosynthèse des AGPI est désormais caractérisée, chez les organismes procaryotes et eucaryotes : une voie anaérobie, qui ne dépend pas d'un système de désaturases/élongases mais qui exploite un mécanisme de polycétides synthases (polykétide synthase, PKS) [17, 64-66]. C'est cette voie qu'empruntent les bactéries des eaux profondes comme *Vibrio marinus*.

Le taux de DHA augmente lorsque la pression s'élève, et diminue lorsque la température s'élève, à l'inverse de ce qui est observé pour l'EPA. Un avantage de la production bactérienne d'AGPI (comme pour les traustochytrides ci-après) réside dans le fait qu'un AGPI quasiment seul est produit au lieu des mélanges complexes issus des huiles de poissons ou des micro-algues nécessitant de coûteuses étapes de purification-préparation.

D'autre part, les bactéries intéressantes ont suscité des investigations relatives aux gènes et aux enzymes impliqués dans cette production à des fins d'optimisation [67-70]. Les stratégies pour développer des nouveaux systèmes de production des AGPI, et du DHA en particulier, s'appuient sur les acquis obtenus par de récents travaux de biochimie, biotechnologie et de génétique concernant les enzymes-clés des processus impliqués : désaturases, élongases,

polycétides synthases (PKS). Chez les bactéries marines barophiles et piézophiles, le DHA se trouve plutôt lié aux phospholipides qu'aux triglycérides, et ce pourrait être un facteur limitant pour le développement de cette source alternative d'huiles riches en acides ω3, bien que des AGPI bactériens aient été utilisés avec succès en aquaculture. Il faut aussi tenir compte des risques de bactéries pathogènes associées limitant par la suite l'acceptation de DHA ainsi produit.

Les micro-algues cultivables riches en DHA/ les dinophycées

Le phytoplancton joue un rôle majeur dans les écosystèmes aquatiques en fournissant oxygène et nutriments de base aux autres organismes des chaînes trophiques [71, 72]. L'abondance et la composition biochimique du phytoplancton dépendent des paramètres environnementaux tels que la lumière, la température, la salinité, la nature des nutriments disponibles. Les micro-algues, grâce à leurs teneurs en AGPI, représentent une source alternative importante, dès lors qu'elles peuvent être cultivées en milieu contrôlé [20, 73-81]. Les conditions de culture influent considérablement sur la composition et la production peut s'orienter vers une composition particulière. La composition en AG est souvent plus simple que celle des huiles de poisson, réduisant les étapes de concentration des AG recherchés. Plusieurs articles récents ont détaillé les avantages et les perspectives des micro-algues productrices des AGPI [20, 21, 34, 35, 53, 55]. Certaines micro-algues sont capables de produire des triglycérides jusqu'à 40-50 % de leur biomasse. Les micro-algues marines ne possèdent pas les

inconvenients présentés par les huiles de poisson (c'est-à-dire absence de cholestérol et d'odeur désagréable) et sont bien perçues par le consommateur en tant que produit naturel d'origine végétale. Les micro-algues comptent désormais au premier plan des sources alternatives aux huiles de poisson pour les AGPI [77]. Il est en effet possible de les produire à une grande échelle dans des photobioréacteurs et en contrôlant tous les paramètres [87, 88].

Plusieurs travaux exploratoires ont permis de mieux connaître la composition en AG des micro-algues marines [71, 82-86]. Une étude pionnière portant sur plusieurs micro-algues avait clairement montré que, exceptée une espèce *Isochrysis*, ce sont les dinophycées comportent les plus élevés en DHA, plusieurs espèces se situant entre 20 et 30 % [48, 73]. Les dinoflagellés sont, avec les diatomées, des producteurs primaires majeurs des chaînes trophiques marines, vivent dans tous les océans et sont en général abondants dans les zones côtières. Le tableau 3 rassemble quelques données sur la composition en EPA et DHA de micro-algues.

C'est l'espèce *Cryptothecodinium cohnii* qui a émergé dès les premières investigations, avec 30 % de DHA dans les AG totaux. D'après une large étude comparative, les bacillariophycées (diatomées), prymnesiophycées, chlorophycées, prasinophycées, raphidophycées, xanthophycées et rhodophycées ne contiennent pas de DHA ou alors à des taux < 1 % des AG totaux, les cryptophycées en contiennent 1-2 %, et les dinophycées de 2,8 à 17,4 % [73, 82]. Une autre étude rapporte cependant des taux de DHA de 4,2-6,1 % chez plusieurs espèces de diatomées (centrales), avec 17,5-26,1 % d'EPA [83]. Parmi les 15 espèces de micro-algues étudiées lors d'un autre criblage, seules une dinophycée et une cryptophycée conte-

Tableau 3. Production d'EPA et de DHA par les micro-algues.

Microalgue	EPA	DHA	Microalgue	EPA	DHA
Microalgues (Dinophycées exceptées)					
<i>Isochrysis/Chrysophycée^a</i>	-	15	<i>Nitzschia/Bacillariophycée^a</i>	17	-
<i>Cricosphaera/Chrysophycée^a</i>	28	-	<i>Chroomonas/Cryptophycée^b</i>	12,9	7,1
Dinophycées/Dinoflagellés					
<i>Amphidinium carterae^a</i>	20	24	<i>Gymnodium kowalevskii^b</i>	0,1	9,5
<i>Ceratium furca^a</i>	7	21	<i>Gymnodium sp.^d</i>	12,6	22,0
<i>Cochlodinium spp.^a</i>	11	28	<i>Gymnodium sanguineum^d</i>	14,1	24,2
<i>Cryptothecodinium cohnii^a</i>	-	30	<i>Prorocentrum spp.^a</i>	15-32	3-5
<i>Gonyaulax spp.^a</i>	12-34	1-16	<i>Prorocentrum mexicanum^c</i>	1,1	18,3
<i>Peridinium triquetum^a</i>	19	2	<i>Prorocentrum micans^c</i>	1,5	22,0
<i>Symbiodinium microadriaticum^d</i>	13,5	9,9	<i>Scrippsiella sp.^d</i>	1,8	18,8
<i>Fragilidium sp.^d</i>	20,9	26,3			

^a Yongmanitchai & Ward [73].

^b Zhukova & Aizdaicher [84].

^c Mansour *et al.* [85].

^d Mansour *et al.* [86].

Tableau 4. Production de DHA par le dinoflagellé *Cryptothecodinium cohnii*, d'après Ward & Singh [34].

Conditions	Durée culture (h)	Biomasse g/L	g/L de DHA	% Biomasse	% Huile	Productivité g/(L jour)	Notes et Référence
Optimisation pour le DHA	72-120	20-40	2,0	20-30	35	0,5	Milieu sur glucose déficient en azote, 28 °C, pH 7-7,8. Kyle [92]
Cultures sur glucose, milieu marin	91	-	1,6	-	43,6	0,52	Produit des lipides à haute teneur en DHA. De Swaaf <i>et al.</i> [93]
Batch, apport de C élevé pour augmenter biomasse et DHA :	400	109	19,0	61	-	1,15	Niveaux élevés de biomasse et de DHA avec acétate ou éthanol. De Swaaf <i>et al.</i> [94]
acétate, glucose, éthanol	220	-	11,7	-	33	1,27	

naient des taux significatifs de DHA, soit 9,5 et 7,1 % [84]. Les recherches se sont alors focalisées sur les dinophycées. Le tableau 3 montre que quelques espèces autres que les dinophycées produisent le DHA, que certaines espèces de dinophycées en contiennent peu et que, surtout, *Cryptothecodinium cohnii* est la seule espèce à fournir le DHA à des taux élevés et seul.

C. cohnii est un dinoflagellé marin primitif qui accumule beaucoup de lipides sous forme de triglycérides. Les proportions relatives des AG sont très dépendantes des conditions de culture. Cultivé dans des conditions optimales, *C. cohnii* peut produire près de 60 % de DHA [43]. *C. cohnii* a été cultivé à pH constant avec l'acétate de sodium comme source principale de carbone et a donné de meilleurs résultats que la culture en batch sur glucose : 20-30 g/L (poids sec) pour les cellules, 40 % de lipides totaux (pds/pds), 50 % de DHA dans les triglycérides, durée 98-144h [89,91]. La société américaine Martek Biosciences Corp. produit, à l'échelle industrielle à partir de *C. cohnii*, du DHA destiné aux formulations de compléments pour enfants [49, 75, 79, 90, 92] (tableau 4). Dans les conditions utilisées, le DHA est l'unique AGPI, à 40 % des AG totaux. L'organisme n'est pas pathogène, la culture peut se faire en fermenteurs de 120 m³ et l'huile n'est pas toxique. Les voies de biosynthèse du DHA dans *C. cohnii* ont été explorées par de Swaaf *et al.* au moyen de marquage au carbone-13 de précurseurs courts [93]. La salinité et le type d'apport en carbone jouent un rôle important. Ce même groupe a décrit une culture en batch, pour la production de DHA à partir de *C. cohnii*, qui conduit à des concentrations exceptionnelles de biomasse (109g/L), de lipides (61g/L) et de DHA (19g/L) pour 400 h de fermentation (tableau 4) [94].

La culture de *C. cohnii* en présence de n-dodécane entraîne une nette amélioration de la production de DHA : 6,14 % de la biomasse et 51 % des AG totaux (durée : 135 h) [95]. Une étude portant sur les phospholipides de plusieurs familles de micro-algues a déterminé les taux suivants en DHA : dinophycées (20,0-24,1), haptophytes (6,7-30,0), bacillarophycées (3,4-9,0), cryptophycées (4,9-11,5) [71].

La mise au point de Ward et Singh dresse une synthèse utile des procédés de production du DHA par les micro-algues et les protistes marins [34].

Il est certain que la micro-algue *C. cohnii* s'est affirmée comme une des sources majeures de DHA pour l'avenir, avec les micro-organismes protistes thraustochytrides présentés ci-dessous.

Les thraustochytrides : des micro-organismes marins très répandus et un gisement prometteur pour le DHA

On trouve au premier rang des meilleures sources microbiennes d'AGPI et de DHA, des protistes exclusivement marins, appartenant aux genres *Thraustochytrium* et *Schizochytrium* [34]. Ce sont des organismes unicellulaires microhétérotrophes, saprophytes voire parasites, qui ont été considérés jusque récemment soit comme des micro-algues soit comme des protistes fungoïdes, et ont été reclassés dans les straménopiles [34, 35, 96]. Il y aurait sept genres et une trentaine d'espèces (ordre des thraustochytriales). Les thraustochytrides ont une large distribution géographique et sont présents dans les estuaires, les zones côtières et toutes les mers y compris en Antarctique. L'essentiel de leur biomasse est concentré dans les sédiments et on a pu aussi parler d'acteurs négligés de la chaîne microbienne marine [97]. C'est vers la fin des années 1980 que sont publiés les premiers résultats prometteurs du point de vue de la maîtrise de la culture et de la production de biomasse, de lipides, d'AGPI [98, 99]. Dans un des premiers exemples rapportés de composition de DHA de trois espèces cultivées de *Thraustochytrium* a permis de sélectionner *T. aureum* qui produit les quantités

de biomasse (4 g/L) et de lipides (10 % poids) de loin les plus importantes (64 % de lipides neutres) [100]. Sous certaines conditions, une souche *T. aureum* produit 5,7 g/L de biomasse, 460 mg/L de lipides totaux avec une proportion de DHA de 40 % [101].

En examinant 57 isolats de thraustochytrides en trois sites ayant des températures différentes en moyenne, Bowles *et al.* ont observé de grandes différences entre quantités obtenues de biomasse, de lipides, de DHA [36]. Les conditions de culture ont une grande influence sur les rendements. Cependant, si les quantités de biomasse obtenues varient beaucoup, on observe que les proportions en EPA et DHA par rapport à cette biomasse restent globalement constantes (tableau 5).

Le DHA peut être obtenu à un taux de 50 % des AG totaux, mais il est nécessaire d'optimiser les conditions de culture pour améliorer les performances s'agissant de la biomasse et des lipides (tableau 6). La production de DHA a été optimisée avec une souche de *Schizochytrium limacinum* SR21. Des rendements > 4 g/L ont été obtenus en utilisant des milieux salés contenant à la fois glucose et glycérol comme sources de carbone, pour 5 jours de culture [107]. La production des AG totaux croît quand l'apport d'azote décroît, et peut atteindre 50 % de la biomasse. Les hauts rendements obtenus semblent liés à la forte teneur en carbone du milieu. Des différences notables sont observées entre les espèces *T. aureum* et *S. limacinum* [108]. Par exemple, la croissance de *T. aureum* est inhibée si le milieu est trop chargé en sel contrairement à *S. limacinum*. *T. aureum* se développe bien en présence de di- et de polysaccharides au contraire de *S. limacinum*. La production de DHA par 9 souches thraustochytrides isolées de mangroves subtropicales a

Tableau 5. Production d'EPA et de DHA par des souches de thraustochytrides (d'après Bowles *et al.* [36]).

Isolat et origine	Biomasse (mg/L)	Lipides/biom. (% poids)	EPA/biom. (% poids)	DHA/biom. (% poids)	% DHA/AG totaux
SW4/4/tempéré froid	113-673	2,0-7,1	0,2-0,5	0,4-3,2	17-47
HSED14/tempéré frais	30-1587	1,6-13,6	0,2-0,6	0,2-2,5	2-40
M6W2/subtropical	710-3140	1,8-37,3	0,2-0,6	0,2-7,8	4-34

Tableau 6. Production de biomasse, lipides et DHA par les thraustochytrides.

Espèce, Souche	Conditions		Production de biomasse, lipides et DHA					Réf.
	Durée j	Temp. °C	Biomasse g/L	Lipides/ Biom. %	/Biom. mg/g	/Biom. mg/L	% AG totaux	
<i>T. aureum</i> ATCC 34304	6	25	3,8	16,5	70	270	49	[98]
<i>T. aureum</i> ATCC 34304	2,5	25	5,7	8,1	–	–	40	[101]
<i>T. roseum</i> ATCC 28210	5	25	7,6	18,2	87	650	50	[102]
<i>T. roseum</i> ATCC 28210	12	25	17,1	25	115	2 100	49	[103]
<i>Thraustochytrium</i> sp. ATCC 20892	4	25	2,7	7,3	25	68	35	[104]
<i>Schizochytrium</i> sp. SR21	2,5	28	21	50	224	4 700	35	[105]
<i>Schizochytrium</i> sp. SR21	4	–	48	77	277	13 300	36	[106]
<i>Schizochytrium limacinum</i> SR21	5	25	38	37	110	4 200	36	[107]

été étudiée : une souche de *S. mangrovei* produisait 2,8 g/L de DHA en 52 heures à 25 °C [109]. Lors de travaux comparatifs de Barclay [110], repris dans la mise au point de Ward et Singh [34], de nombreux nouveaux isolats de thraustochytrides ont été examinés, et certains d'entre eux se sont avérés très productifs en AGPI. Ainsi, une souche de *Schizochytrium* (S9) produit le DHA comme quasi unique AGPI ω3. Près de 80 % des AG totaux d'une souche particulière (ATCC 20892) sont des AGPI ω3. Certaines souches de thraustochytrides produisent de 87-92 % d'EPA. Les taux relevés de DHA dans ces travaux se situent entre 18,1 et 60,1 % et cet AG est associé à l'EPA (2,3-18,9 %), au DPA 22 :5 n-6 (0-20,5 %) et à l'acide arachidonique (1,5-18,6 %).

La question des systèmes régissant la biosynthèse des AGPI a déjà été évoquée avec les bactéries marines et mérite un développement dans le cas des thraustochytrides [17, 34]. En effet, ceux-ci possèdent une Δ4-désaturase qui leur permet le passage direct du 22 :5 n-3 au 22 :6 n-3. Ce résultat a été établi dans le cas d'une souche de *Thraustochytrium* (ATCC 21685) qui possède aussi une Δ5-désaturase opérant en série n-6 [35, 111]. Un gène, codant pour une protéine avec activité Δ4-désaturase dans une levure et une plante, a été cloné à partir d'une souche de thraustochytride [111]. À l'instar des bactéries, certaines souches de thraustochytrides produisant des AGPI possèdent aussi le système de biosynthèse des polycétides synthases PKS [17, 65]. Il a même été suggéré que la voie des PKS prédomine chez *Schizochytrium* tandis que la voie classique des élongases/désaturases semble dominante chez *Thraustochytrium* [111].

Le fait d'obtenir dans de nombreux cas un mélange de plusieurs AGPI, y compris de la série n-6, apparaît comme un handicap au seul vu de la production de DHA. Cependant, il est

important de faire remarquer que certaines potentialités supplémentaires des thraustochytrides pourraient aussi justifier une production à grande échelle. L'insaponifiable d'une souche *Thraustochytrium* (ATCC 26185) contenait un taux élevé (62 %) de squalène, pourcentage modulable suivant les conditions de culture, produit très recherché pour ses applications, en cosmétologie par exemple [35, 112, 113]. Ils pourraient d'autre part représenter une source importante de caroténoïdes [114]. D'autre part, on a isolé d'une souche *Thraustochytrium globosum* un type de structure moléculaire très rare et n'ayant été trouvé que dans un genre (*Agelas*) d'éponge marine, des α-glycosylcéramides originaux [115]. Ces glycolipides à configuration anomérique unique sont connus pour leurs propriétés anti-tumorales, et un analogue conçu par modulation structure-activité (KRN 7000) est actuellement aux essais cliniques (cité par Kornprobst [35]).

Il y a encore beaucoup à explorer dans le domaine prometteur des thraustochytrides, tant dans la recherche et l'évaluation de nouvelles espèces que dans l'optimisation des conditions de culture [116] ou les avancées du génie génétique [117, 118], afin d'améliorer les rendements et d'atteindre une certaine sélectivité dans la production des AGPI.

Le génie génétique : des perspectives appelées à un développement rapide

L'identification de différents gènes codant pour des élongases et des désaturases impliquées dans la biosynthèse du DHA et de l'EPA ouvre la voie à d'importantes applications biotechnologiques. Ces gènes peuvent être utilisés dans la production d'huiles de végétaux transgéné-

ques. Certaines approches de ce type ont déjà été citées dans la partie concernant les protistes producteurs. Une meilleure compréhension de la régulation par les gènes de la biosynthèse des AGPI aura des conséquences sur la production industrielle des cellules isolées comme, par exemple, la manipulation des conditions de croissance des micro-algues en vue d'augmenter les rendements [17, 33, 34, 111].

Conclusion

La demande en DHA va sans doute encore augmenter et, dans ce contexte, les efforts de la recherche pour mettre au jour de nouvelles sources vont se poursuivre. Des efforts de recherche-développement se déploient actuellement pour trouver les procédés qui permettront de valoriser durablement les quantités énormes de déchets et co-produits halieutiques puisqu'il a été montré que ceux-ci contiennent des taux importants de composés valorisables comme les AGPI, les phospholipides, les protéines. Les dinophycées et les protistes marins thraustochytrides apparaissent comme les organismes les plus prometteurs pour une production massive de DHA, mais il reste un vaste champ d'investigation pour évaluer de nouvelles espèces et pour perfectionner les méthodes de culture et les méthodes d'extraction et purification.

RÉFÉRENCES

- GUESNET P, ALESSANDRI JM, ASTORG P, PIFFERI F, LAVIALLE M. Les rôles physiologiques majeurs exercés par les acides gras polyinsaturés (AGPI). *OCL* 2005 ; 12 : 333-43.
- LI DL, BODE O, DRUMMOND H, SINCLAIR AJ. Omega-3 (n-3) fatty acids. In : Gunstone FD, ed. *Lipids for Functional Foods and Nutraceuticals*. UK : The Oily Press Lib/Lipid Technol, 2003 : 225-62 ; (13).

3. CALDER PC, BUDRGE GC. Fatty acids. In : Nicolaou A, Kokotos G, eds. *Bioactive Lipids*. UK : The Oily Press Lib/Lipid Technol, 2003 : 1-36 ; (17).
4. CONNOR WE. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *Am J Clin Nutr* 2000 ; 71 : 171S-175S.
5. ARTS MT, ACKMAN RG, HOLUB BJ. "Essential fatty acids" in aquatic ecosystems : a crucial link between diet and human health and evolution. *Can J Fish Aquat Sci* 2001 ; 58 : 122-37.
6. CUNNANE SC. Problems with essential fatty acids : time for a new paradigm? *Prog Lipid Res* 2003 ; 42 : 544-68.
7. HORROCKS LA, YEO YK. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacol Res* 1999 ; 40 : 211-25.
8. MADSEN T, SKOU HA, HANSEN VA, et al. C-reactive protein, dietary n-3 fatty acids, and the extent of coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2001 ; 88 : 1139-42.
9. BROUWER IA, GEELAN A, KATAN MB. n-3 Fatty acids, cardiac arrhythmia and fatal coronary heart disease. *Prog Lipid Res* 2006 ; 45 : 357-67.
10. JUDÉA S, ROGER S, MARTELA E, et al. Dietary long-chain omega-3 fatty acids of marine origin : A comparison of their protective effects on coronary heart disease and breast cancers. *Prog Biophys Mol Biol* 2006 ; 90 : 299-325.
11. BOURRE JM. Roles of unsaturated fatty acids (especially omega-3 fatty acids) in the brain at various ages and during ageing. *J Nutr Health Aging* 2004 ; 3 : 163-74.
12. ALESSANDRI JM, GUESNET P, VANCASSEL S. Polyunsaturated fatty acids in the central nervous system : evolution of concepts and nutritional implications throughout life. *Reprod Nutr Dev* 2004 ; 44 : 509-38.
13. BOURRE JM. Acides gras oméga-3 alimentaires et neuropsychiatrie. *OCL* 2004 ; 11 : 362-70.
14. KYLE DJ. The role of docosahexaenoic acid in the evolution and function of human brain. *New Comprehensive Biochem* 2002 ; 35 : 1-22.
15. WAINWRIGHT PE. Dietary essential fatty acids and brain function : a developmental perspective on mechanisms. *Proc Nutr Soc* 2002 ; 61 : 61-9.
16. CHALON S. Acides gras polyinsaturés et fonctions cognitives. *OCL* 2001 ; 4 : 317-20.
17. BERGÉ JP, BARNATHAN G. Recent advances in fatty acids from lipids of marine organisms : molecular biodiversity, roles as biomarkers, biologically-active compounds and economical aspects. In : Le Gal Y, Ulber R, eds. *Marine Biotechnology*. Berlin : Springer-Verlag, 2005 ; (96) : 49-125 ; (Series Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology).
18. MASUDA R. The critical role of docosahexaenoic acid in marine and terrestrial ecosystems : from bacteria to human behavior. In : Brown HI, Skiftesvik AB, eds. *The Big Fish Bang. Proceed. 26th Annual Larval Fish Conference*. Bergen, Norway : Publ. by Instit Mar Res, 2003 : 249-56.
19. FAO FISHERIES DEPARTMENT. *Situation mondiale des pêches et de l'aquaculture, SOFIA*. 2004 ; (164 p).
20. HENDERSON RJ. The production of n-3 polyunsaturated fatty acids in marine organisms. *Lipid Technol* 1999 : 5-10.
21. VALENTINE RC, VALENTINE DL. Omega-3 fatty acids in cellular membranes : a unified concept. *Prog Lipid Res* 2004 ; 43 : 383-402.
22. FODOR E, JONES RH, BUDA C, KITAJKA K, DEY I, FARKAS T. Molecular architecture and biophysical properties of phospholipids during thermal adaptation in fish : an experimental and model study. *Lipids* 1995 ; 30 : 1119-26.
23. WALLAERT C, BABIN PJ. Thermal adaptation affects the fatty acid composition of plasma phospholipids in trout. *Lipids* 1994 ; 9 : 373-6.
24. CORRAZE G, KAUSHIK S. Les lipides des poissons marins et d'eau douce. *OCL* 1999 ; 6 : 111-5.
25. PENG J, YVAN LARONDELLE Y, PHAMA D, ACKMAN RG, ROLLIN X. Polyunsaturated fatty acid profiles of whole body phospholipids and triacylglycerols in anadromous and landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fry. *Comp Biochem Physiol* 2003 ; 134 B : 335-48.
26. ACKMAN RG, RATNAYAKE WMN, OLSSON B. The "basic" fatty acid composition of atlantic fish oils : Potential similarities useful for enrichment of polyunsaturated fatty acids by urea complexation. *J Am Oil Chem Soc* 1988 ; 65 : 136-8.
27. SARGENT JR. (n-3) Polyunsaturated fatty acids and farmed fish. In : Hamilton RJ, Rice RD, Barnes PJ, et al., eds. *Fish oil : Technology, nutrition and marketing*. 1995 : 67-94.
28. NJINKOUÉ JM, BARNATHAN G, MIRALLÈS J, GAYDOU EM, SAMB A. Lipids and fatty acids in muscle, liver and skin of three edible fish from the Senegalese coast : *Sardinella maderensis*, *Sardinella aurita* and *Cephalopholis taeniops*. *Comp Biochem Physiol* 2002 ; 131 B : 395-402.
29. OULD EL KEBIR MV, BARNATHAN G, SIAU Y, MIRALLÈS J, GAYDOU EM. Fatty acid distribution in muscle, liver, and gonads of rays (*Dasyatis marmorata*, *Rhinobatos cemiculus*, and *Rhinoptera marginata*) from the East tropical Atlantic Ocean. *J Agric Food Chem* 2003 ; 51 : 1942-7.
30. OULD EL KEBIR MV, BARNATHAN G, SIAU Y, MIRALLÈS J, GAYDOU EM. Fatty acid distribution in muscle, liver, and gonads of three tropical rays including non-methylene-interrupted dienoic fatty acids. *Lipids* 2007 ; (sous presse).
31. RASOARAHONA JRE, BARNATHAN G, BIANCHINI JP, GAYDOU EM. Annual evolution of fatty acid profile from muscle lipids of the common carp (*Cyprinus carpio*) in Madagascar inland waters. *J Agric Food Chem* 2004 ; 52 : 7339-44.
32. RASOARAHONA JRE, BARNATHAN G, BIANCHINI JP, GAYDOU EM. Influence of season on the lipid and fatty acid profiles of three Tilapia species (*Oreochromis niloticus*, *O. macrochir* and *O. rendalli*) from Madagascar. *Food Chem* 2005 ; 91 : 683-94.
33. LEONARD AE, PEREIRA SL, SPRECHER H, HUANG YS. Elongation of long-chain fatty acids / Review. *Prog Lipid Res* 2004 ; 43 : 36-54.
34. WARD OP, SINGH A. Omega-3/6 fatty acids : Alternative sources of production. *Process Biochem* 2005 ; 40 : 3627-52.
35. KORNPROBST JM. *Substances Naturelles d'Origine Marine - Chimiodiversité, Pharmacodiversité, Biotechnologies*. Londres, Paris, New York : Editions TEC & DOC Lavoisier, 2005 ; (Tome 1, 598 p).
36. BOWLES RD, HUNT AE, BREMER GB, DUCHARS MG, EATON RA. Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid production by members of the marine protistan group the thraustochytrides : screening of isolates and optimisation of docosahexaenoic acid production. *J Biotechnol* 1999 ; 70 : 193-202.
37. RATLEDGE C. Opportunities for marine microorganisms for the production of polyunsaturated fatty acids. In : Le Gal Y, Muller-Feuga A, eds. *Marine microorganisms for industry*. Plouzané, Actes de colloques, Ifremer Éditions, 1997 : 18-25 ; (21).
38. RATLEDGE C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie* 2004 ; 86 : 807-15.
39. SIJTSMA L. Swaaf de ME. Biotechnological production and applications of the ω 3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004 ; 64 : 146-53.
40. SINGH A, WARD OP. Microbial production of docosahexaenoic acid (DHA, C22 : 6). In : Needleman SL, Laskin AI, eds. *Adv Appl Microbiol*. 1997 : 271-312 ; (45).
41. LINDER M, FANNI J, PARMENTIER M. Extraction, fractionnement et concentration des huiles marines. *OCL* 2004 ; 11 : 123-30.
42. AOKI T, OTAKE I, GOTOH N, NOGUCHI N, WADA S. Quantification method for triglyceride molecular species in fish oil with high performance liquid chromatography - ultraviolet detector. *J Oleo Sci* 2004 ; 53 : 285-94.
43. LUCIEN FP, LIONG KK, COTTON NJ, FOSTER NR. Separation of biomolecules using supercritical fluid extraction. *Australas Biotechnol* 1993 ; 3 : 143-7.

44. BARTH D. Fractionnement par le dioxyde de carbone supercritique et urée. *OCL* 2004 ; 11 : 131-2.
45. HSIEH CW, CHANG CJ, KO WC. Supercritical CO₂ extraction and concentration of n-3 polyunsaturated fatty acid ethyl esters from tuna cooking juice. *Fish Sci* 2005 ; 71 : 441-7.
46. HALLDORSSON A, KRISTINSSON B, GLYNN C, HARALDSSON GG. Separation of EPA and DHA in fish oil by lipase-catalyzed esterification with glycerol. *J Am Chem Oil Soc* 2006 ; 80 : 915-21.
47. LINDER M, FANNI J, PARMENTIER M. Fractions lipidiques obtenues à partir des coproduits de la filière halieutique. *OCL* 2006 ; 13 : 12-5.
48. ROBLES MEDINA A, GIMENEZ GIMENEZ A, GARCIA CAMACHO F, SANCHEZ PEREZ JA, MOLINA GRIMA E, CONTRERAS GOMEZ A. Concentration and purification of stearidonic, eicosapentaenoic, docosahexaenoic acids from cod liver oil and the marine microalga *Isochrysis galbana*. *J Am Oil Chem Soc* 1995 ; 72 : 575-83.
49. ZUTA CP, SIMPSON BK, CHAN HM, PHILLIPS L. Concentrating PUFA from mackerel processing waste. *J Am Oil Chem Soc* 2003 ; 80 : 933-6.
50. GBOGOURI GA, LINDER M, FANNI J, PARMENTIER M. Analysis of lipids extracted from salmon (*Salmo salar*) heads by commercial proteolytic enzymes. *Eur J Lipid Sci Technol* 2004 ; 108 : 766-75.
51. DUMAY J, DONNAY-MORENO C, BARNATHAN G, JAOUEN P, BERGÉ JP. Improvement of phospholipid extraction from sardine (*Sardina pilchardus*) heads by means of hydrolysis with industrial proteases. *Process Biochem* 2006 ; 41 : 2327-32.
52. DUMAY J. Thèse Université de Nantes, Ifremer, 2006, 303 p.
53. DALSGAARD J, JOHN M, KATTNER G, MÜLLER-NAVARRA D, HAGEN W. Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. *Adv Mar Biol* 2003 ; 46 : 225-340.
54. RUSSELL NJ, NICHOLS DS. Polyunsaturated fatty acids in marine bacteria - a dogma rewritten. *Microbiology* 1999 ; 145 : 767-79.
55. NICHOLS DS. Prokaryotes and the input of polyunsaturated fatty acids to the marine food web. *FEMS Microbiol Lett* 2003 ; 219 : 1-7.
56. WADA M, FUKUNAGA N, SASAKI S. Aerobic synthesis of unsaturated fatty acids in a psychrophilic bacterium, *Pseudomonas* sp. strain E-3, having two mechanisms for unsaturated fatty acid synthesis. *J Gen Appl Microbiol* 1991 ; 37 : 355-62.
57. NICHOLS PD, NICHOLS DS, LEWIS T, et al. Novel bacteria as alternative sources of polyunsaturated fatty acids for use in aquaculture and other industries. In : Le Gal Y, Muller-Feuga A, eds. *Marine microorganisms for industry*. Plouzané, Actes de colloques, Ifremer Editions, 1997 : 26-32 ; (21).
58. BOWMAN JP, MC CAMMON SA, NICHOLS DS, et al. *Shewanella gelidimarina* sp. nov. and *Shewanella frigidimarina* sp. nov., novel Antarctic species with the ability to produce eicosapentaenoic acid (20 :5 ω 3) and grow anaerobically by dissimilatory Fe(III) reduction. *Int J Syst Bacteriol* 1997 ; 47 : 1040-7.
59. BOWMAN JP, GOSINK JJ, MC CAMMON SA, et al. *Colwellia demingiae* sp. nov., *Colwellia hornerae* sp. nov., *Colwellia rossensis* sp. nov. and *Colwellia psychrotropica* sp. nov. : psychrophilic Antarctic species with the ability to synthesize docosahexaenoic acid (22 :6 ω 3). *Int J Syst Bacteriol* 1998 ; 48 : 1171-80.
60. MOULE AL, WILKINSON SG. Polar lipids, fatty acids, and isoprenoid quinones of *Alteromonas putrefaciens* (*Shewanella putrefaciens*). *Syst Appl Microbiol* 1987 ; 9 : 192-8.
61. YANO Y, NAKAYAMA A, SAITO H, ISHIHARA K. Production of docosahexaenoic acid by marine bacteria isolated from deep sea fish. *Lipids* 1994 ; 29 : 527-8.
62. YANO Y, NAKAYAMA A, YOSHIDA K. Distribution of polyunsaturated fatty acids in bacteria present in intestines of deep-sea fish and shallow-sea poikilothermic animals. *Appl Environ Microbiol* 1997 ; 63 : 2572-7.
63. DELONG EF, YAYANOS AA. Biochemical function and ecological significance of novel bacterial lipids in deep-sea prokaryotes. *Appl Environ Microbiol* 1986 ; 51 : 730-7.
64. NAPIER JA. Plumbing the depths of PUFA biosynthesis : a novel polyketide synthase-like pathway from marine organisms. *Trends Plant Sci* 2002 ; 7 : 51-4.
65. METZ J, ROESSLER P, FACCIOTTI D, ET AL. Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eucaryotes. *Science* 2001 ; 5528 : 290-3.
66. FANG J, CHAN O, KATO C, SATO T, PEEPLES T, NIGGEMEYER K. Phospholipid fatty acids of piezophilic bacteria from the deep sea. *Lipids* 2003 ; 38 : 885-7.
67. TANAKA I, UENO A, KAWASAKI K, et al. Isolation of clustered genes that are notably homologous to the eicosapentaenoic acid biosynthesis gene cluster from the docosahexaenoic acid-producing bacterium *Vibrio marinus* strain MP-1. *Biotechnol Lett* 1999 ; 21 : 939-45.
68. MORITA N, TANAKA M, OKUYAMA H. Biosynthesis of fatty acids in the docosahexaenoic acid-producing bacterium *Moritella marina* strain MP-1. *Biochem Soc Trans* 2000 ; 28 : 943-5.
69. NICHOLS DS, SANDERSON K, BOWMAN JL, et al. Developments with antarctic microorganisms : culture collections, bioactivity screening, taxonomy, PUFA production and cold-adapted enzymes. *Curr Opin Biotechnol* 1999 ; 10 : 240-6.
70. ALLEN EE, BARTLETT DH. Structure and regulation of the omega-3 fatty acid synthase genes from the deep-sea bacterium *Photobacterium profundum* strain SS9. *Microbiology* 2002 ; 148 : 1903-13.
71. DIJKMAN NA, KROMKAMP JC. Phospholipid-derived fatty acids as chemotaxonomic markers for phytoplankton : application for inferring phytoplankton composition. *Mar Ecol Prog Ser* 2006 ; 324 : 113-25.
72. REUSS N, POULSEN LK. Evaluation of fatty acids as biomarkers for a natural plankton community. A field study of a spring bloom and a post-bloom period off West Greenland. *Mar Biol* 2002 ; 141 : 423-34.
73. YONGMANITCHI W, WARD OP. Omega-3 fatty acids : alternative sources of production. *Process Biochem* 1989 ; 24 : 117-25.
74. BARCLAY W, ABRIL R, ABRIL P, WEAVER C, ASHFORD A. Production of docosahexaenoic acid from microalgae an its benefits for use in animal feeds. *World Rev Nutr Diet* 1998 ; 83 : 61-76.
75. KYLE DJ. The large-scale production and use of a single-cell oil highly enriched in docosahexaenoic acid. In : *Omega-3 Fatty Acids : Chemistry, Nutrition and Health Effects*, Shahidi F, Finley JW eds, Am Chem Soc, Washington, pp. 92-107.
76. ZELLER S, BARCLAY W, RUBEN A. Production of docosahexaenoic acid from microalgae. In : *Omega-3 Fatty Acids : Chemistry, Nutrition and Health Effects*, Shahidi F, Finley JW eds, Am Chem Soc, Washington, pp. 108-24.
77. POISSON L, DEVOS M, PENCREACH G, ERGAN F. Acides gras polyinsaturés de microalgues : intérêts et développements actuels. *OCL* 2002 ; 9 : 92-5.
78. PENCREACH G, DEVOS M, POISSON L, HERAULT J, LOISEAU C, ERGAN F. Les microalgues marines : source alternative d'acide eicosapentaénoïque (EPA) et d'acide docosahexaénoïque (DHA). *OCL* 2004 ; 11 : 118-22.
79. KYLE DJ. Production and use of a single cell oil highly enriched in docosahexaenoic acid. *Lipid Technol* 1996 ; 8 : 107-10.
80. MULLER-FEUGA A. *Microalgues marines - Les enjeux de la recherche*. Editions Ifremer, Plouzané, Bilan et perspectives, 1997 ; (35 p).
81. ROBLES MEDINA A, MOLINA GRIMA E, GIMENEZ GIMENEZ A, IBANEZ GONZALEZ MJ. Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids. *Biotechnol Adv* 1998 ; 16 : 517-80.
82. VISO AC, MARTY JC. Fatty acids from 28 marine microalgae. *Phytochemistry* 1993 ; 34 : 1521-33.
83. DUNSTAN GA, VOLKMAN JK, BARETT SM, LEROI JM, JEFFREY SW. Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatom (Bacillariophyceae). *Phytochemistry* 1994 ; 35 : 155-61.

84. ZHUKOVA NV, AIZDAICHER NA. Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. *Phytochemistry* 1995 ; 39 : 351-6.
85. MANSOUR MP, VOLKMAN JK, HOLSWORTH DG, JACKSON AE, BLACKBURN SI. Very long-chain (C₂₈) highly unsaturated fatty acids in marine dinoflagellates. *Phytochemistry* 1999 ; 50 : 541-8.
86. MANSOUR MP, VOLKMAN JK, JACKSON AE, BLACKBURN SI. The fatty acid and sterol composition of five marine dinoflagellates. *J Phycol* 1999 ; 35 : 710-20.
87. MÜLLER-FEUGA A, BARON R, LE GUÉDES R, MICHEL E. Theoretical assessment of productivity in photobioreactors by radiative transfer approach. In : Le Gal Y, Müller-Feuga A, eds. *Marine microorganisms for industry*. Plouzané, Ifremer, 1998 : 194-201.
88. PULZ O. Photobioreactors : production systems for phototrophic microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001 ; 57 : 287-93.
89. RATLEDGE C, KANAGACHANDRAN K, ANDERSON AJ, GRANTHAM DJ, JANET C, STEPHENSON C. Production of docosahexaenoic acid by *Cryptocodinium cohnii* grown in a pH-auxostat culture with acetic acid as principal carbon source. *Lipids* 2001 ; 36 : 1241-6.
90. HAUMANN BF. Alternative sources for n-3 fatty acids. *Am Oil Chem Soc, Inform* 1998 ; 9 : 1108-19.
91. JIANG Y, CHEN F. Production potential of docosahexaenoic acid by the heterotrophic marine dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*. *Process Biochem* 1999 ; 34 : 633-7.
92. KYLE DJ. Microbial oil mixtures and uses thereof. *Brevet USA* 1994 ; N° 5 : 374-657.
93. SWAAF DE ME, RIJK DE TC, MEER VAN DER P, EGGINK G, SIJTSMA L. Analysis of docosahexaenoic acid biosynthesis in *Cryptocodinium cohnii* by ¹³C labeling and desaturase inhibitor experiments. *J Biotechnol* 2003 ; 103 : 21-9.
94. SWAAF DE ME, PRONK JT, SIJTSMA L. Fed-batch culture of the docosahexaenoic acid-producing marine alga *Cryptocodinium cohnii* on ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003 ; 61 : 40-3.
95. DA SILVA TL, MENDES A, MENDES RL, et al. Effect of dodecane on *Cryptocodinium cohnii* fermentations and DHA production. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2006 ; 33 : 408-16.
96. LECOINTRE G, LE GUYADER H. *Classification phylogénétique du vivant*, Belin, Paris, 543 p.
97. KIMURA H, NAGANUMA T. Thraustochytrids : a neglected agent of the marine microbial food chain. In : *Aquatic Ecosystem Health and Management*. Taylor and Francis Ltd, 2001 : 13-8 ; (4).
98. BAJPAI P, BAJPAI P, WARD OP. Optimisation of production of docosahexaenoic acid (DHA) by *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304. *J Am Oil Chem Soc* 1991 ; 68 : 509-14.
99. BAJPAI P, PRAMOD K, BAJPAI PK, WARD OP. Production of docosahexaenoic acid by *Thraustochytrium aureum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1991 ; 35 : 706-10.
100. KENDRICK A, RATLEDGE C. Lipids of selected molds grown for production of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 1992 ; 27 : 15-20.
101. IIDA I, NAKAHARA T, YOKOCHI T, et al. Improvement of docosahexaenoic acid production in a culture of *Thraustochytrium aureum* by medium optimization. *J Ferment Bioeng* 1996 ; 81 : 76-8.
102. LI ZY, WARD OP. Production of docosahexaenoic acid by *Thraustochytrium roseum*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 1994 ; 13 : 238-41.
103. SINGH A, WARD OP. Production of high yields of docosahexaenoic acid by *Thraustochytrium roseum* ATCC 28210. *J Ind Microbiol Biotechnol* 1996 ; 16 : 370-3.
104. SINGH A, WILSON S, WARD OP. Docosahexaenoic acid (DHA) production by *Thraustochytrium* sp. ATCC 20892. *World J Microbiol Biotechnol* 1996 ; 12 : 76-81.
105. NAKAHARA T, YOGOCHI T, HIGASHIRA T, TANAKA S, YAGUCHI T, HONDA D. Production of docosahexaenoic and docosapentaenoic acids by *Schizochytrium* sp. isolated from Yap Islands. *J Am Oil Chem Soc* 1996 ; 73 : 1421-6.
106. YAGUCHI T, TANAKA S, YOGOCHI T, NAKAHARA T, HIGASHIRA T. Production of high yields of docosahexaenoic acid by *Schizochytrium* sp. strain SR21 : biotechnology. *J Am Oil Chem Soc* 1996 ; 74 : 1431-4.
107. YOKOCHI T, HONDA D, HIGASHIHARA T, NAKAHARA T. Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. *Appl Microbiol Biotechnol* 1998 ; 49 : 72-6.
108. LEWIS TE, NICHOLS PD, MCMEEKIN TA. The biotechnological potential of Thraustochytrids. *Mar Biotechnol* 1999 ; 1 : 580-7.
109. FAN KW, CHEN F, JONES EBG, VRIJMOED LLP. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids production by and okara-utilizing potential of thraustochytrids. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2001 ; 27 : 199-202.
110. BARCLAY WR. Method of aquaculture feeding microflora having a small cell aggregate size. *Brevet USA* 1997 ; N° 5 : 500-688.
111. QIU X, HONG H, MAC KENZIE SL. Identification of a $\Delta 4$ fatty acid desaturase from *Thraustochytrium* sp. involved in the biosynthesis of docosahexanoic acid by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *Brassica juncea*. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 31561-6.
112. WEETE JD, KIM H, GANDHI SR, WANG Y, DUTE R. Lipids and ultrastructure of *Thraustochytrium* sp. ATCC 26185. *Lipids* 1997 ; 32 : 839-45.
113. LEWIS TE, NICHOLS PD, MCMEEKIN TA. Sterol and squalene content of a docosahexaenoic-acid-producing thraustochytrid : influence of culture age, temperature and dissolved oxygen. *Mar Biotechnol* 2001 ; 3 : 439-47.
114. AKI T, HACHIDA K, YOSHINAGA K, et al. Thraustochytrid as a potential source of carotenoids. *J Am Oil Chem Soc* 2003 ; 80 : 789-94.
115. JENKINS KM, JENSEN PR, FENICAL W. Thraustochytrids A-C : new glycosphingolipids from a unique marine protist, *Thraustochytrium globosum*. *Tetrahedron Lett* 1999 ; 40 : 7637-40.
116. UNAGUL P, ASSANTACHAI C, PHADUNGRUENGLUIJ S, SUPHANTHARIKA M, VERDUYN C. Properties of the docosahexaenoic acid-producer *Schizochytrium mangrovei* Sk-02 : effects of glucose, temperature and salinity and their interaction. *Bot Mar* 2005 ; 48 : 387-94.
117. NAPIER JA. The production of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in transgenic plants. *Eur J Lipid Sci Technol* 2006 ; 108 : 965-72.
118. GRAHAM IA, LARSON T, JOHNATHAN A, NAPIER JA. Rational metabolic engineering of transgenic plants for biosynthesis of omega-3 polyunsaturates. *Curr Opin Biotechnol* 2007 ; (sous presse).